

**Einfluss der Milz auf die Altersstruktur von
Plasmodium-falciparum-Populationen
im peripheren Blut**

**Untersuchung anhand einer kontrollierten prospektiven Kohortenstudie
in einem Malaria tropica-Endemiegebiet, Malawi/Ostafrika**

DISSERTATION

**Zur Erlangung des akademischen Grades
doctor medicinae (Dr. med.)**

**vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena**

von

**Annika Gabriele Pullwitt
geboren am 29.12.1978 in Leipzig**

Gutachter:

1. Prof. Dr. W. Pfister, Jena
2. Prof. Dr. P. Wutzler, Jena
3. PD Dr. O. Bach, Stonehaven/Schottland

Tag der öffentlichen Verteidigung: 03.07.2006

I: INHALTSVERZEICHNIS

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	IV
1. ZUSAMMENFASSUNG.....	VII
2. EINLEITUNG	1
2.1. Die Milz.....	1
2.1.1. Die Milz als sekundäres lymphatisches Organ (Allgemeines).....	1
2.1.2. Bedeutung der Milz für die rote Blutzelle	2
2.1.3. Milzimmunologie.....	3
2.2. Die Malaria tropica.....	5
2.2.1. Epidemiologie/Bedeutung der Malaria tropica	5
2.2.2. Asexueller Zyklus von <i>Plasmodium falciparum</i>	6
2.2.3. Malariaimmunologie.....	7
2.2.4. Zytoadhärenz.....	9
2.2.5. HIV und Malaria	12
2.3. Milzfunktion und Malaria im Tiermodell	14
2.3.1. Milzfunktion und Malaria im NagermodeLL.....	14
2.3.2. Milzfunktion und Malaria im Affenmodell	16
2.4. Die Funktion der Milz in der humanen Plasmodieninfektion	17
2.5. Folgen der Splenektomie auf die Malaria tropica-Infektion	18
3. ZIELE DER ARBEIT	19
4. MATERIAL UND METHODEN	20
4.1. Studiendesign	20
4.2. Untersuchungsmaterial	21
4.2.1. Malaria.....	21
4.2.2. HIV	21
4.3. Analyse des Untersuchungsmaterials.....	21
4.3.1. Malaria.....	21
4.3.2. HIV	25
4.4. Schweregrade der Malaria.....	26
4.5. Statistische Auswertung	27
4.6. Votum der Ethikkommission	27

5. ERGEBNISSE.....	28
5.1. Beschreibung der Patientengruppen.....	28
5.2. Methodenetablierung.....	30
5.2.1. Anzahl und Auswahl der Ausstriche.....	30
5.2.2. Aussagekraft der semiquantitativen Analyse.....	31
5.2.3. Einfluss der totalen Anzahl der altersbestimmten Parasiten pro Ausstrich auf die Anzahl älterer Stadien.....	38
5.3. Auftreten und Einfluss der Parasitämie.....	39
5.3.1. Unterschiede in der Häufigkeit von Parasitämien zwischen Splenektomierten und Kontrollen.....	39
5.3.2. Unterschiede in der Höhe der Parasitämien zwischen Splenektomierten und Kontrollen.....	40
5.3.3. Einfluss der Höhe der Parasitämie auf die Anzahl älterer Stadien im peripheren Blut unabhängig vom Milzstatus	42
5.3.4. Einfluss der Höhe der Parasitämie auf den Anteil älterer Stadien im peripheren Blut abhängig vom Milzstatus	43
5.4. Vorkommen älterer Parasitenstadien im peripheren Blut	45
5.4.1. Kommen ältere Parasitenstadien während Parasitämie gehäuft im Blut von.... Splenektomierten vor als in Kontrollen?.....	45
5.4.2. Transfer der „Patientenpunkte“ in ein Patientenmerkmal.....	49
5.4.3. Modifikation der Analyse in 5.4.2. auf die Häufigkeit der Parasitämien während des Beobachtungszeitraumes.....	51
5.5. Andere Einflussfaktoren auf die Parasitämie bzw. das Vorkommen älterer Parasitenstadien im peripheren Blut.....	52
5.5.1. HIV-Status der Patienten	52
5.5.2. Auftreten und Einfluss der Parasitämie	54
5.5.3. Vorkommen älterer Parasitenstadien.....	57
5.6. Klinische Ausprägung der Malaria und Unterschiede zwischen Splenektomierten und Kontrollen.....	62

6. DISKUSSION	63
6.1. Methodendiskussion	63
6.1.1. Patientenrekrutierung	63
6.1.2. Auswahl der für die Altersbestimmung genutzten Ausstriche	64
6.1.3. Durchführung der Parasitämie- und Altersbestimmung	66
6.2. Inzidenz von Parasitämie	67
6.3. Höhe der Parasitämie	69
6.4. Vorkommen von älteren Parasitenstadien	71
6.5. HIV- und Malaria-Co-Infektion	75
6.6. Schwere der Erkrankung	77
7. SCHLUSSFOLGERUNGEN	81
8. LITERATUR- UND QUELLENVERZEICHNIS	83
9. ANHANG	91
9.1. Votum der Ethikkommission	91
9.2. Patientenfragebögen	92
9.3. Abbildungsverzeichnis	97
9.4. Tabellenverzeichnis	98
10. TABELLARISCHER LEBENSLAUF	100
11. DANKSAGUNG	101
12. EHRENWÖRTLICHE ERKLÄRUNG	102

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AIDS	Acquired immune deficiency syndrome/erworbenes Immunschwächesyndrom
APZ	Antigenpräsentierende Zelle
ARDS	Adult respiratory distress syndrome/Atemnotsyndrom des Erwachsenen
BP	Blood pressure/Blutdruck
BS	Bowel sounds/Darmgeräusche
bzw.	beziehungsweise
C	Kontrollen
C3b	Komplementfaktor 3b
ca.	circa
CD	Cluster of differentiation
CNS	Central nervous system/Zentralnervensystem
CSA	Chondroitin-Sulphat A
DBL	Duffy-binding-like (Protein Familie)
d. h.	das heißt
Dx	Diagnosis/Diagnose
E	Splenektomierte
ELAM	Endothelial-leucocyte adhaesion molecule/Endotheliales Leukozyten Adhäsionsmolekül
ELISA	Enzyme-linked immuno-sorbent assay
ESR	Erythrocyte sink reaction/Blutsenkungsgeschwindigkeit
etc.	et cetera
Fc-Rezeptor	Rezeptor für den konstanten Teil von Antikörpern
FSU	Friedrich-Schiller-Universität Jena
gen. cond.	General condition/Allgemeinbefinden
GPI	Glycosyl-Phosphatidyl-Inositol
g/dl	Gramm pro Deziliter
HB/Hb	Hämoglobin
HIV	Human immunodeficiency virus
HK	Hämatokrit
HPF	High Power Field/1000-fache Vergrößerung mit Ölimmersion im Lichtmikroskop

HR	Heart rate/Herzfrequenz
Hx	History/Anamnese
ICAM	Intercellular adhaesion molecule/Interzelluläres Adhäsionsmolekül
I.e.	id est/das heißt
IgG/IgM	Immunglobulin G/M (Antikörper)
IL	Interleukin
IFN	Interferon
l	left/links
LCH	Lilongwe Central Hospital/Lilongwe Zentralkrankenhaus
Mean	Mittelwert
MESA	Mature parasite surface antigen/Oberflächenantigen des reifen Parasiten
MHC	Major histocompatibility complex/Haupthistokompatibilitäts-Genkomplex
Mio.	Millionen
MM	most likely malaria/wahrscheinliche Malaria
mmHG	Millimeter Quecksilbersäule (Einheit für den Blutdruck)
mmol/l	Millimol pro Liter
MP	Malariaparasiten
MPS	mononukleäres Phagozytensystem
Mrd.	Milliarden
n	Anzahl
NO	Stickstoffmonoxid
o. ä.	oder ähnliches
OPSI	Overwhelming postsplenectomy infection
P	asymptomatic parasitaemia/asymptomatische Parasitämie
PALS	periarterielle Lymphozytenscheide
Pat.	Patient
PECAM	Platelet-endothelial cell adhaesion molecule/Thrombozyten-Endothelzell Adhäsionsmolekül
PfEMP	Plasmodium falciparum Erythrozytenmembranprotein
P.	Plasmodium der verschiedenen Spezies
PM	proven malaria/bewiesene Malaria
pRBC	parasitierte/von Parasiten befallene Rote Blutzelle
QUECH	Queen Elisabeth Central Hospital/Zentralkrankenhaus in Blantyre
r	right/rechts

R	Repairs/Milzerhaltend Operierte
RBC	Red blood cell/Rote Blutzellen
RDS	Respiratory distress syndrome/Atemnotsyndrom
RESA	Ringform erythrocyte surface antigen/Ringform Erythrozyten Oberflächenantigen
RNI	Reactive nitrogen intermediates/Reaktive Stickstoffintermediate
RP	residual parasitaemia/Residualparasitämie
RR	Blutdruck in mmHG
TNF	Tumornekrosefaktor
S+	Patienten mit nachweisbarem Milzgewebe
S-	Patienten ohne nachweisbares Milzgewebe
SEM	Standard Error of Mean/Standartfehler des arithmetischen Mittels
SM	severe malaria/Schwere Malaria
SPSS	Superior Performance Software System/statistisches Auswertungsprogramm
STD	Sexual transmitted disease/Sexuell übertragbare Krankheit
T/A	Traditional authority/malawische Verwaltungseinheit
Temp	Temperature/Temperatur
Tx	Treatment/Behandlung
u. a.	und andere
UGT	Urogenital tract/Urogenitaltrakt
UTI	Urinary tract infection/Urogenitale Infektion
USS	Ultrasound Scan/Ultraschalluntersuchung
usw.	und so weiter
VCAM	Vascular-cell adhaesion molecule/Gefäßzellen Adhäsionsmolekül
vgl.	vergleiche
vs.	versus
WBC	White blood cell/Weiße Blutzellen
WHO	World Health Organisation/Weltgesundheitsorganisation
z. B.	zum Beispiel
ZCH	Zomba Central Hospital/Zomba Zentralkrankenhaus

1. Zusammenfassung

Die Malaria ist eine der bedeutendsten parasitären Erkrankungen des Menschen (Cook 1998). Sie ist von enormer gesundheits- sowie wirtschaftsökonomischer Relevanz in den Ländern der Dritten Welt und dabei besonders im (sub)-tropischen Afrika. Sie verursacht jährlich viele Millionen klinische Erkrankungen und Todesfälle. Dabei gehen die meisten der Todesfälle auf Kosten von *Plasmodium falciparum*, dem Erreger der Malaria tropica, der in vielen Ländern Sub-Saharan-Afrikas, darunter in Malawi, endemisch ist.

Bei der Abwehr der Malariainfektion spielt die Milz, so wird angenommen, eine entscheidende Rolle. Das zeigt sich anhand experimenteller Malariainfektionen im Nager- und Affenmodell aber auch in der humanen Malaria, in der Splenektomierte zu häufigeren, schwereren und verlängerten Infektionen neigen (Maharaj et al. 1982, Israeli et al. 1987, Looareesuwan et al. 1993, Boone und Watters 1995, Pongponratn et al. 2000 u.a.).

Außerdem hat die Milz vermutlich Einfluss auf die Pathophysiologie der Malaria tropica, indem sie unter anderem die Exprimierung von parasitären Oberflächenantigenen und damit die sogenannte Zytoadhärenz/Sequestration reifer Parasitenstadien beeinflusst (Barnwell 1982/1983, Styrt 1990 u.a.). Dies geht mit der erstmaligen Beobachtung reifer Parasitenstadien im peripheren Blut von Splenektomierten einher (Israeli et al. 1987).

Diese prospektive Kohortenstudie wurde in Malawi, einem Endemiegebiet für *Plasmodium falciparum*, von Januar 1999 bis Februar 2000 an einer der bis zu diesem Zeitpunkt größten Gruppen von Splenektomierten, milzerhaltend Operierten sowie dazu gematchten Kontrollen durchgeführt. Die Patienten wurden zwischen Januar 1995 und Juni 1999 mit der Diagnose traumatische Milzruptur an einem der 3 Zentralkrankenhäuser Malawis (QUECH, ZCH, LCH) operativ behandelt.

Ziel der Untersuchungen sollte sein, die Rolle der Milz bzw. deren immunologische Funktion während der Malariainfektion, die bis jetzt noch nicht vollkommen verstanden ist, zu untersuchen. Es sollten Folgen der Splenektomie auf die Infektion, Prognose und Schwere der Erkrankung aufgedeckt werden und dabei ein besonderes Augenmerk auf die Altersstruktur der *Plasmodium falciparum* Parasiten im peripheren Blut gelegt werden.

Dies sollte zu generellen Aussagen über Splenektomierte und Malariainfektion in den Tropen führen und könnte möglicherweise Einfluss auf die Therapie der traumatischen Milzruptur in einem Malariaendemiegebiet haben.

Außerdem sollte die HIV- und Malaria-Co-Infektion betrachtet werden, die durch hohe Prävalenz beider Erkrankungen im südlichen Afrika häufig vorkommt.

Wir untersuchten über den oben genannten Zeitraum 33 Splenektomierte, 33 Kontrollen und 10 milzerhaltend Operierte monatlich, also mehrfach. Dabei wurden bei jeder Konsultation Blutproben d. h. insgesamt über 2500 Blutaussstriche für die mikroskopische Malariaanalyse gewonnen. Die Analyse der Malariaausstriche erfolgte zunächst semiquantitativ.

Nachfolgend wurde in allen positiven Ausstrichen versucht eine tatsächliche quantitative Parasitämiebestimmung vorzunehmen. Dies führte zu einer Selektion von 96 Ausstrichen für die Altersbestimmung der Malariaparasiten, die nach einer von uns modifizierten Klassifikation in 6 Stadien eingeteilt wurden (vgl. Silamut und White 1993).

Weiterhin versuchten wir bei allen Patienten mindestens einmalig eine HIV-Statusbestimmung vorzunehmen sowie während der monatlichen Visiten eine Befragung hinsichtlich Malariasymptomen durchzuführen. Die Schweregrade der Malaria wurden in 5 Kategorien eingeteilt.

Wir fanden, dass Splenektomierte während des Untersuchungszeitraumes insgesamt häufigere und höhere Parasitämien zeigten. Es kamen mit Ausnahme von Schizonten ältere Parasitenstadien häufiger im Blut von Milzlosen vor, jedoch sind späte Stadien auch in der peripheren Zirkulation von Milzgesunden zu finden. Hinsichtlich der klinischen Symptomatik neigen Splenektomierte häufiger zu symptomärmeren Formen der Malariainfektion. Schwere Erkrankungen wurden aber in keiner der Untersuchungsgruppen beobachtet.

Ein Zusammenhang zwischen HIV-Infektion und Parasitämieinzidenz, -höhe und Vorkommen älterer Parasitenstadien konnte nicht gezeigt werden.

Insgesamt lässt sich für die Milzfunktion in Malarainfektionen anhand unserer Beobachtungen sagen, dass sie für die parasitäre Abwehr d. h. die antiparasitäre Komponente der Immunantwort in Plasmodium falciparum-Infektionen sowie wahrscheinlich für die Exprimierung zytoadhärenzfördernder Antigene von großer Bedeutung ist.

Dass die Milz aber in endemischen Regionen nicht essentiell für die Abwehr der Malariainfektion ist, da malariaexponierte Menschen sogenannte Semiimmunität entwickeln. Bei dieser ist besonders die antitoxische Immunität, die zur Symptomreduktion führt wichtig.

2. Einleitung

2.1. Die Milz

2.1.1. Die Milz als sekundäres lymphatisches Organ (Allgemeines)

Die Milz ist das größte sekundäre lymphatische Organ des Menschen. Sie ist umgeben von einer zweischichtigen, bindegewebigen Kapsel, von deren innerem fibroelastischen Anteil ausgehend Trabekel ins Innere des Organs ziehen.

Diese vereinen sich mit einem retikulären Fasernetzwerk, welches die Organstruktur aufrecht erhält.

Das Milzgewebe selbst wird in die rote und weiße Pulpa unterteilt.

Die weiße Pulpa macht ca. 20 % des Parenchyms aus und lässt sich in 3 funktionelle Kompartimente untergliedern:

- die die Zentralarterie umgebende periarterielle Lymphozytenscheide (PALS)
- die Lymphfollikel
- die Marginalzone.

Die rote Pulpa macht etwa 80 % des Parenchyms aus. Sie besteht aus Sinus und Sinusoiden sowie diese umgebende Milzstränge aus retikulären Fasern, Fibrozyten, Makrophagen, Thrombozyten, Lymphozyten, Neutrophilen und Plasmazellen.

Die Milz wird von einem speziellen Gefäßsystem durchzogen, wobei sich die Arteria lienalis, die am Hilus in das Organ eintritt, zunächst in ca. 4-10 Trabekelarterien aufteilt. Diese werden nach verlassen der Trabekel von so genannten PALS umgeben und heißen Zentralarterien. Sie geben weitere Äste zur Marginalzone und zu den Lymphfollikeln ab.

Die Zentralarterien spalten sich in die Pinselarteriolen und dem gefolgt in Hülsen- und Endkapillaren auf. Aus diesen gelangen die Blutzellen entweder über den „offenen Kreislauf“ (etwa 10 % des durch die Milz zirkulierenden Blutvolumens) in das retikuläre Fasernetzwerk der roten Pulpa oder über den „geschlossenen Kreislauf“ (etwa 90 % des durch die Milz zirkulierenden Blutvolumens) direkt in die venösen Sinusoide. Die Wand der Sinusoide besteht aus längsverlaufenden, spindelförmigen Zellen, zwischen denen schlitzförmige Lücken verbleiben durch, die die Blutzellen in das Gefäßlumen ein- und austreten können.

Der Blutabfluss erfolgt über venöse Kapillaren in Trabekelvenen, die am Milzhilus in die Vena lienalis münden.

Aus dieser besonderen Architektur der Milz ergeben sich deren vielfältige Funktionen wie Blutzellmauserung, -speicherung, immunologische Prägung, Lymphozytenvermehrung, sowie Bindung und Abbau roter Blutzellen, Fremdkörper und Mikroorganismen/intraerythrozytärer Erreger, zum Beispiel Plasmodium falciparum.

2.1.2. Bedeutung der Milz für die rote Blutzelle

Wie bereits erwähnt, spielt die Milz eine wichtige Rolle in der roten Blutzellprozession, Blutzellmauserung und -bildung sowie deren Abbau und Speicherung. Verschiedene durch die Milz gesteuerte Mechanismen dienen der „Bearbeitung“ der roten Blutzellen.

Zunächst wird der Blutfluss bei Eintritt in die rote Pulpa reduziert. Dadurch und durch das so genannte „Plasmaskimming“ in die Marginalzone steigt der Hämatokrit stark an. Dies ermöglicht einerseits einen verlängerten Zell-Zellkontakt zwischen den RBC und den retikuloendothelialen Zellen bzw. Phagozyten. Andererseits führt es zu verschiedenen nachteiligen Membranveränderungen an der roten Zelle (Verlust von Oberflächenladung, verminderte Verformbarkeit und osmotische Resistenz der Membran) mit nachfolgend vermehrter Retention an den Schlitzten der venösen Sinus.

Darüber hinaus tragen das „RBC-Pitting“, d. h. das Entfernen von Einschlüssen und Partikeln wie Eisen, Howell Jolly Körper oder beispielsweise Malariaparasiten aus der roten Zelle und das „RBC-Culling“, d. h. die komplette Entfernung von selektiven oder pathologisch veränderten Erythrozyten zu deren Qualitätskontrolle bei.

Während all dieser Vorgänge kommt es wahrscheinlich auch zu metabolischen Veränderungen der roten Blutzelle mit Zunahme energieverbrauchender Prozesse, nachfolgender Hypoxie und deren verstärkter Filterung.

All diese Mechanismen wie Filterung, Rückhaltung von roten Zellen an den Schlitzmembranen der Sinusoide bei verminderter Verformbarkeit der Membran, Phagozytose und mechanische Zellschädigung spielen eine große Rolle in der Alterung der Erythrozyten und dem Entfernen von pathologischen Blutzellen aus der Zirkulation.

Die Art der Pathologie ist dabei wesentlich bestimmend für den Mechanismus der Clearance.

Die Milz ist außerdem zur Hämatopoese im Fetus und bei pathologisch-hämatologischen Zuständen befähigt sowie wesentlich an der Reifung von Retikulozyten zu Erythrozyten beteiligt (nach Splenektomie kommt es zum Anstieg der Retikulozyten im peripheren Blut). Sie speichert darüber hinaus einen Teil der Blutzellen.

2.1.3. Milzimmunologie

In der Milz findet man die größte Ansammlung lymphatischer Zellen des menschlichen Körpers. Sie enthält 25 % der austauschbaren T-Lymphozyten und 15 % der austauschbaren B-Lymphozyten. Organisiert sind diese Zellen in den bereits genannten 3 funktionellen Kompartimenten.

Die Marginalzone enthält sehr viele Lymphozyten sowie Monozyten und wird von einem großen Anteil des durch die Milz zirkulierenden Blutvolumens durchflossen. Sie ist eine der ersten Kontaktstellen zwischen antigenhaltigem Blut und immunkompetenten Zellen und damit wesentlich an der Regulation der Immunantwort beteiligt. Von dort aus wandern B-Zellen in die Lymphfollikel und T-Zellen in die periarteriellen Lymphozytenscheiden (PALS). Diese Zellen stehen dabei dennoch in ständigem Kontakt zur Zirkulation.

Die Hauptfunktionen der Marginalzone sind also Zirkulationsaustausch, Zell-Zell-Kontaktstelle und Verteilerfunktion für die verschiedenen Zellen.

Die PALS enthalten hauptsächlich T-Lymphozyten im Verhältnis CD 4:CD 8 wie 2:1 vergleichbar dem peripheren Blut, und zusätzlich spezialisierte retikuläre Zellen, die für die Antigenpräsentation an die T-Zellen verantwortlich sind.

Die Lymphfollikel können, je nach Aktivierungsgrad, in Primär- und Sekundärfollikel unterteilt werden. Die Primärfollikel sind Follikel in inaktivem Zustand und enthalten kleine, nichtaktive B-Lymphozyten, die aus dem zirkulierenden Pool stammen. Sie exprimieren IgM bzw. IgD und MHC II an ihrer Oberfläche.

Die Sekundärfollikel enthalten in der Mantelzone ebenfalls kleine B-Lymphozyten. In den germinativen Zentren dagegen große aktivierte B-Lymphozyten, die Fc-Rezeptoren, C3b-Rezeptoren und verschiedene andere Aktivierungsantigene exprimieren. Daneben finden sich hier CD 4 positive T-Helferzellen und Makrophagen.

Von dort aus wandern, nach Abschluss der Aktivierung und Ausreifung, die zu Plasma- oder Gedächtniszellen umgewandelten B-Zellen zurück in die systemische Zirkulation.

Durch die große Vielfalt und Anzahl an verschiedenen immunkompetenten Zellen ist die Milz durch verschiedene Effektormechanismen wesentlich an der Antigenabwehr, aber auch an der Immunologie körpereigener Pathologien, beteiligt.

Sie ist Hauptort der spezifischen Antikörper Produktion durch B-Lymphozyten in Zusammenarbeit mit T-Lymphozyten. So zeigt sich beispielsweise eine Reduktion der IgM-Serumkonzentration nach Splenektomie und eine eingeschränkte Zweitreaktion auf Antigene, wenn der Erstkontakt nach Splenektomie stattfand.

Das bedeutet, dass kein normaler IgM-IgG-Klassenwechsel erfolgt, wahrscheinlich bedingt durch mangelnde Bildung von T-/B-Gedächtniszellen (Cuschieri und Forbes 1994).

Weiterhin ist die Milz wichtig im Zusammenhang mit der Abwehr von durch Polysaccharid bekapselte Bakterien verursachten Infektionen, da hier die Antikörperbildung T-Zell-unabhängig stattfindet. Die in der Marginalzone angesiedelte spezielle Population phagozytischer, polysaccharid-bindender Zellen, die in engem Kontakt zu ortständigen B-Zellen stehen, sind wahrscheinlich wichtig für die Abwehr dieser polysaccharid-bekapselten Bakterien. Antikörper und Komplementproduktion durch die Milz sind ebenfalls relevant für die Prävention von überschießenden Infektionen durch diese Bakteriengruppe, da hierdurch auch die Clearance der Leber beeinflusst wird.

In der Antigenabwehr ist auch die Phagozytose durch Makrophagen sowie retikuloendotheliale und andere Zellen ein wichtiger in der Milz stattfindender Prozess, der durch dort gebildete Antikörper (IgG) und Komplementfaktor C3b, sogenanntes Opsonin, noch gesteigert werden kann. Daneben ist die Milz, durch die große Anzahl verschiedener Zellen, auch ein Hauptproduktionsort von Zytokinen und anderen immunregulatorischen Peptiden. Sie ist der einzige Bildungsort der ersten Stufe des Tuftsin, welches ebenfalls ein Phagozytosestimulator ist.

Weitere durch die Milz kontrollierte Effektor- und Regulationsmechanismen der Immunantwort sind T-Helfer und T-Suppressorzellen, die die Antikörperproduktion regulieren. Nach Splenektomie zeigt sich dies in einer reduzierten Zahl von zirkulierenden T-Helferzellen (Cuschieri und Forbes 1994).

Die T-Helferzellen (Th-1-Zellen) produzieren darüber hinaus einen wichtigen Makrophagen stimulierenden Faktor, das Interferon γ , welches ist unter anderem wichtig für die Malariaabwehr ist.

2.2. Die Malaria tropica

2.2.1. Epidemiologie/Bedeutung der Malaria tropica

Malaria ist die wohl bedeutendste parasitäre Erkrankung des Menschen (Cook 1998). Sie hat nicht nur enorme klinische sondern auch wirtschaftliche bzw. sozioökonomische Bedeutung. Sie verursacht immense Kosten durch Arbeits- und Schulausfälle sowie im Gesundheitswesen. 3 bis 8 % der Schulausfälle gehen auf Kosten von Malaria (Holding und Snow 2001). Die Malaria wird unter anderem als ein Grund für Armut und geringes wirtschaftliches Wachstum in den Ländern der Tropen/Subtropen gesehen (Gallup und Sachs 2001).

In einem Malariaendemiegebiet wie Malawi betrug der Verlust an Wirtschaftswachstum zwischen 1980 und 1995 insgesamt 1,072 Mio. US\$, das entspricht einem Anteil des Einkommens 1995 von 18 % (Sachs und Malaney, 2002).

Circa 40 % der Weltbevölkerung lebt in nur 100 Ländern mit endemischer Malaria bzw. lebte im Jahr 1994 unter Malariarisiko (World Health Organisation 1997, Murphy und Breman 2001), davon sind ca. 500 Millionen Menschen in Sub-Sahara Afrika unter konstanter Malariaexposition (Gyatt und Snow 2001, Greenwood und Mutabingwa 2002). 1997 starben laut WHO 2,7 Milliarden Menschen weltweit an Malaria. Mindestens 90 % der Todesfälle an Malaria sind in Sub-Sahara Afrika zu verzeichnen (Greenwood und Mutabingwa 2002). Andere Schätzungen gehen von einer direkt malariaassoziierten Todesrate von einer Million Menschen in Afrika aus, wovon 75 % Kinder sind. Besonders hoch ist die malariabedingte Todesrate bei Kindern unter 5 Jahren. Sie liegt bei 25 bis 30 % (WHO 1997, Breman 2001).

Die dominierende Form der Malaria in Afrika ist die Malaria tropica. Diese, durch den Erreger Plasmodium falciparum übertragene, schwerste Form der Malaria hat nach Schätzungen der WHO 1994 zu 100 Millionen klinischen Fällen geführt (Murphy und Breman 2001).

Sie verursacht besonders schwerwiegende Komplikationen wie zerebrale Malaria, schwere Anämie, hohes Fieber, Lungenödem/RDS, Hypoglykämie, akutes Nierenversagen, Splenomegalie, Verbrauchskoagulopathie/Thrombozytopenie, Schwangerschaftsmalaria bzw. damit assoziiertes niedriges Geburtsgewicht (Steketee 2001). Nahezu alle Todesfälle und Fälle schwerer Malaria gehen auf Kosten von *Plasmodium falciparum*. Beispielsweise beträgt die Mortalität der zerebralen Malaria 20 %. In 10 % der Fälle ist mit bleibenden neurologischen Schäden zu rechnen (Greenwood und Mutabingwa 2002).

2.2.2. Asexueller Zyklus von *Plasmodium falciparum*

Plasmodium falciparum wird durch die infizierte weibliche Anophelesmücke übertragen. Diese injiziert bei einem Stich 8 bis 15 motile Sporozoiten. Es können aber auch Werte bis zu 100 Sporozoiten pro Stich erreicht werden.

Die Sporozoiten gelangen entweder direkt oder über Lymphbahnen in den systemischen Kreislauf. Sie erreichen innerhalb von 30 bis 45 Minuten die Leber oder sind aus der Zirkulation entfernt worden. Jeder Sporozoit gelangt aktiv in eine Leberzelle, wo die präerythrozytäre Schizogonie, d. h. die intrahepatozelluläre Teilung innerhalb von 5,5 Tagen stattfindet. Dabei entstehen Gewebeschizonten, die bis zu 30.000 Merozoiten enthalten, welche nach Ruptur der Hepatozyten wieder in die Blutbahn gelangen.

Die freigesetzten Merozoiten sind, ähnlich den Sporozoiten, gut beweglich und heften sich über spezielle Oberflächenrezeptoren an die Erythrozyten.

Nach der Oberflächenbindung der Merozoiten kommt es zur Inokulation. Die Erreger bohren sich durch die Membran der Erythrozyten und befinden sich dann innerhalb einer Vakuole, bestehend aus Teilen der Erythrozytenmembran, in der roten Blutzelle.

Im Erythrozyten kommt es zu Beginn der Entwicklung des Parasiten zunächst zur Ausbildung von Ringformen bzw. frühen Trophozoiten. Diese konsumieren die Bestandteile des Zytoplasmas der roten Blutzelle d. h. vorwiegend Hämoglobin, welches durch proteolytische Aktivität zerlegt wird. Die dabei freigesetzten Aminosäuren nutzen die Parasiten zur eigenen Proteinsynthese. Dabei wird der Hämanteil des Hämoglobins von seinem Proteingerüst befreit. Es entsteht eine toxische Eisenform, die wiederum spontan zu Hämozoin (Malariapigment) polymerisiert. Dieses ist dann in der Vakuole des wachsenden Parasiten in späteren Stadien nachweisbar.

Des Weiteren baut der Parasit während seiner intraerythrozytären Entwicklung verschiedene Transportproteine zur Nährstoffaufnahme und zum Elektrolytausgleich in die Membran der roten Zelle ein. Dadurch und durch das intrazelluläre Parasitenwachstum wird die Membran permeabler, weniger elastisch verformbar.

Nach ca. 24 bis 26 Stunden wird durch *Plasmodium falciparum* ein hochmolekulares Antigen (knob like protein) an der Erythrozytenoberfläche exprimiert. Dieses dient der Zytoadhärenz an Endothelien von Venolen oder Kapillaren mit der Folge, dass die infizierten Erythrozyten aus dem peripheren Blut verschwinden (Sequestration).

Ungefähr 36 Stunden nach der Merozoiteninvasion kommt es intraerythrozytär zur vermehrten Zellteilung. Dabei entstehen Blutschizonten, die nach Ruptur der Erythrozyten zwischen 8 und 32 Merozoiten in die Zirkulation entlassen. Diese können dann wiederum neue Erythrozyten befallen. Der gesamte intraerythrozytäre Entwicklungszyklus von *Plasmodium falciparum* hat eine Dauer von ungefähr 48 Stunden.

2.2.3. Malariaimmunologie

In der Abwehr der akuten Malariainfektion spielt das unspezifische (angeborene) Abwehrsystem d. h. die Monozyten/Makrophagen als wichtigste Effektorzellen im direkten Angriff gegen parasitierte Erythrozyten sowie andere phagozytierende Zellen, z. B. Neutrophile und das Komplementsystem eine wesentliche Rolle. Das spezifische (erworbene) Immunsystem bestehend aus der zellulären- (T-Zellen/B-Zellen) bzw. der humoralen Komponente (protektive Antikörper) ist ebenso von Bedeutung.

Der Hauptort der Phagozytose ist die Milz. Sie kann durch Komplementfaktoren (Faktor C3b), IgG-Antikörper (via Fc-Rezeptor) und durch von T-Lymphozyten produzierte Zytokine (IFN γ von Th-1-Zellen) gesteigert werden. Monozyten/Makrophagen sezernieren daneben lösliche Faktoren und Zytokine wie TNF α , IL 1, NO/NO-Intermediate. Diese lösen inflammatorische Reaktionen aus, haben einen direkten zytotoxischen Effekt auf Parasiten/pRBC (zytotoxischer Effekt von TNF α auf asexuellen Blutstadien von *Plasmodium falciparum*) und können zusätzlich die Phagozytose erhöhen (TNF α).

Getriggert werden kann die Freisetzung von TNF α , IL 1 und in deren Gefolge IL 6/IL 8 durch ein bakterienendotoxinähnliches Glycolipid (GPI), das bei Merontenruptur freigesetzt wird.

Die genannten und andere Zytokine haben verschiedene Effekte. Sie beeinflussen die Zytoadhärenz, verursachen klinische Symptome (z. B. Fieber durch IL 1) und aktivieren die verschiedenen zellulären Komponenten der Abwehr.

Antigenpräsentierende Zellen (APZ) sind z. B. Makrophagen und dendritische Zellen. Sie haben ebenfalls Einfluss auf die Aktivierung der spezifischen zellulären Immunantwort. Von ihnen aufgenommene und prozessierte Antigene werden über MHC II an naive T-Zellen präsentiert, die sich daraufhin und abhängig vom Zytokinmilieu in Th-1- oder Th-2-Zellen differenzieren.

Während der Akutinfektion ist die initiale Reaktion zwischen dendritischen Zellen und pRBC an die IL-12-Bildung und damit die Th-1-Aktivierung gekoppelt. Dies führt zu einer verstärkten inflammatorischen Reaktion im Mausexperiment (Langhorne 2004). Im späteren Verlauf der Erkrankung dominiert dann die Th-2-Reaktion mit IL-4-/ IL-10-Bildung, was zur Hemmung der inflammatorischen Reaktion, Reduktion der Symptome und Induktion der spezifischen Antikörperproduktion führt. Darüber hinaus werden auch CD 8+ zytotoxische T-Zellen (Antigenpräsentation über MHC I) aktiviert, die die direkte Zytolyse, z. B. von befallenen Leberzellen, bewirken. Dabei existieren im mit Sporozoiten immunisierten Menschen spezifische CD 8+-Zellen für verschiedene Epitope von *P. falciparum*-Sporozoiten-Antigen (Morrot und Zavala 2004).

Natürlich sind im Rahmen der Malariaabwehr auch protektive Antikörper von Wichtigkeit. Während der natürlichen Infektion findet man zunächst eine nur schwach ausgebildete und kurz anhaltende Antikörperreaktion auf Sporozoitenantigenen. Sporozoiten und Leberstadien sind weniger immunogen. Die von ihnen gebildeten Antigene sind weniger polymorph, d. h., die natürliche Immunität ist gegenüber diesen Stadien limitiert, und die Entwicklung von Blutstadien kann nicht verhindert werden (Struik und Riley 2004).

Darüber hinaus kommt es während der Akutinfektion zunächst zur polyklonalen B-Zellaktivierung mit der vorwiegenden Bildung von unspezifischen IgM-/IgG-2-Antikörpern. Diese wird ausgelöst durch eine Vielzahl von Antigenen mit kreuzreagierenden Epitopen, die Freisetzung von inflammatorischen Zytokinen und die Th-1-Zellaktivierung. Im folgenden Krankheitsverlauf sowie nach mehreren Infektionen kommt es eher zur Bildung von parasitenspezifischen IgG-1-/IgG-3-Antikörpern.

Erschwert wird die spezifische Antikörperbildung durch die Polymorphie von Antigenen mit repetitiven Sequenzen, verschiedenen antigenen Varianten (z.B. bei Pf EMP-1-Antigen), welche immundominant sind.

In natürlichen Malariainfektionen ist die Immunität niemals sterilisierend, da die Parasiten nicht komplett entfernt werden. Die Immunität reduziert nur das Parasitenwachstum und die klinischen Symptome. Das bezeichnet man als Semiimmunität. Des weiteren ist die erworbene Immunität stadien- und artspezifisch, d. h., die Immunität bildet sich zunächst nur gegenüber einer Parasitenart aus. In endemischen Regionen erwirbt der Mensch somit im Laufe von Jahren und mehreren Infektionen ein Gedächtnis für die lokalen Parasitenarten. Gegenüber dem parasitären Glycolipid/GPI oder Malariatoxin entwickelt sich schrittweise eine so genannte antitoxische Immunität, d. h., es werden Anti-GPI-Antikörper gebildet, die deren toxischen Effekt reduzieren bzw. klinische Toleranz vermitteln (Schofield und Hackett 1993, Naik et al. 2000).

Insgesamt kann man sagen, dass die Immunologie der Malaria sehr komplex ist. Die natürlich erworbene Immunität scheint darauf ausgerichtet zu sein durch ständige Re-Infektionen (natürliche Boosterung) eine hohe Parasitämie (antiparasitäre Immunität) sowie klinische Symptome zu verhindern (antitoxische Immunität). Persistierendes Antigen ist notwendig, um hohe Antikörpertiter und damit die „premunitio“, d. h. den Widerstand gegenüber der Erkrankung aufrechtzuerhalten, obwohl T- und B-Gedächtniszellen auch ohne Antigen längere Zeit überleben können (Struik und Riley 2004).

2.2.4. Zytoadhärenz

Die Zytoadhärenz ist einer der wesentlichen pathophysiologischen Mechanismen der Plasmodium-falciparum-Infektion. Sie beginnt in der Mitte des 48-stündigen asexuellen Entwicklungszyklus des Parasiten. Zytoadhärenz bedeutet, dass parasitierte Erythrozyten vorwiegend an Venolen aber auch Kapillaren verschiedener Organe wie Gehirn, Herz, Leber, Nieren, Plazenta, Darm sowie Fettgewebe, Haut aber auch der Milz binden. Demzufolge sind reife Parasitenstadien im peripheren Blut gar nicht bzw. selten zu finden und sind, wenn vorhanden ein Indiz für eine schwere Infektion (Silamut und White 1993, Miller et al. 2000).

Die Zytoadhärenz geschieht über eine artspezifische Familie von hochmolekularen parasitären Proteinen (Pf EMP). Die am häufigsten beschriebenen und wohl wichtigsten Proteine sind die Pf EMP 1.

Sie werden an die Oberfläche der parasitierten Erythrozyten transferiert, bestehen aus 5 verschiedenen DBL-Domänen, 1 bis 2 histidinreichen Zwischendomänenregionen, einer Transmembranregion sowie einem intrazellulären Segment. Sie imponieren elektronenmikroskopisch als Teil der sogenannten „knobs“ (Chen et al. 2000), (Abbildung 1).

Bedeutungsvoll für diese Proteingruppe ist, dass sie von einer variablen Multigenfamilie, den so genannten var-Genen, bestehend aus 50 bis 150 verschiedenen Genen, lokalisiert auf unterschiedlichen Chromosomen kodiert wird (Ramasamy 1998, Richie und Saul 2002).

In jedem asexuellen Zyklus machen ca. 2 % der in vitro kultivierten Parasiten eine antigene Variation mit Folge eines unterschiedlichen Phänotyps durch (Smith et al. 1995, Chen et al. 2000, Miller et al. 2002). In vivo erfolgt die antigene Variation wahrscheinlich mit höherer Frequenz (Peters et al. 2002).

Wichtig in diesem Zusammenhang ist, dass Subpopulationen von *Plasmodium falciparum* existieren, die „knob-negativ“ sind, dennoch PfEMP 1 exprimieren und in statischen Systemen in vitro ebenfalls zytoadhärieren (Udomsangpetch et al. 1989, Waller et al. 1999). Eine stabile Zytoadhärenz unter Flussbedingungen, d. h. der in vivo Situation entsprechend, ist jedoch an das Vorhandensein von „knobs“ gebunden (Waller et al. 1999, Ho und White 1999).

Des Weiteren wurden verschiedene andere parasitäre Oberflächenproteine (z. B. PfEMP 2, Sequestrin, MESA, RESA, das modifizierte RBC-Zytoskelettprotein band 3) identifiziert, die im Zusammenhang mit Zytoadhärenz ebenso betrachtet werden müssen.

Die wichtigsten endothelialen Liganden für die parasitären Oberflächenproteine sind CD 36, ICAM 1 und CSA. Dabei vermitteln nur CD 36 und CSA eine stabile Bindung unter statischen Bedingungen (Greenwood und Mutabingwa 2002).

CD 36 kommt vorwiegend auf Monozyten/Makrophagen, Thrombozyten und Endothel vor. Es ist der wahrscheinlich wichtigste Bindungspunkt für parasitierte Erythrozyten. 90 % der Wildtypen von *Plasmodium falciparum* binden unter stationären Bedingungen an CD 36, und unter Flussbedingungen ist nur die Bindung an CD 36 stabil (Ho und White 1999, Yipp et al. 2000). CD 36 konnte eine Beteiligung an der Zytoadhärenz in verschiedenen Organen mit Ausnahme des Gehirns nachgewiesen werden. Die Bindung an CD 36 ist proportional zur Parasitämie und korreliert mit der Schwere der Erkrankung.

An ICAM 1 adhären 10 % der Wildtypen von *Plasmodium falciparum* unter stationären Bedingungen. Dieses Adhäsionsprotein ist weit über das venöse Endothel verteilt, wurde aber vorwiegend an zerebralen Gefäßen nachgewiesen (Ho und White 1999). Es kann durch verschiedene Zytokine (IL 1, TNF α , IFN γ) hochreguliert werden. Die Folge ist eine erhöhte Zytoadhärenz (Ho und White 1999).

Die Zytoadhärenz wird von ICAM 1 und CD 36 synergistisch beeinflusst.

Das Chondroitin-Sulphat A ist ein Glycosaminoglycan, das als Hauptmolekül die Bindung an plazentare Gefäße vermittelt (Ho und White 1999). Dabei scheinen Parasitenisolate aus der Plazenta gegenüber Isolaten von Nichtschwangeren über einzigartige Bindungseigenschaften zu verfügen, da sie an CSA aber nicht an CD 36 adhären (Miller et al. 2002).

Neben CD 36, ICAM 1 und CSA sind noch andere Rezeptoren, z. B. Thrombospondin, PECAM 1, VCAM 1, ELAM, E-/P-Selektin u. a., bekannt (Scherf et al. 1998). Sie haben im Rahmen der Zytoadhärenz eher eine unterstützende Funktion wie Fangen oder Rollen der parasitierten RBCs als die Vermittlung einer stabilen Bindung (Ho und White 1999).

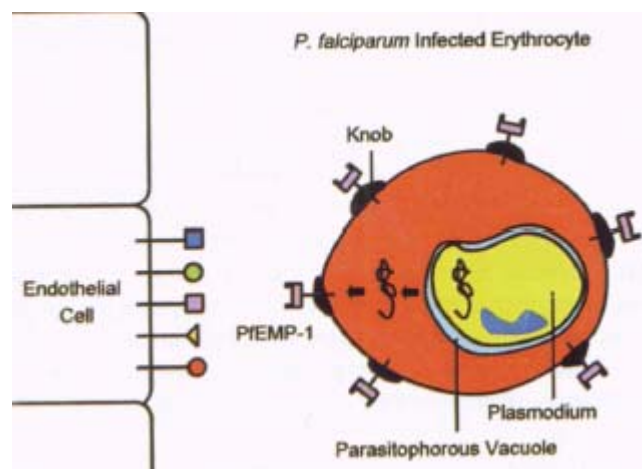


Abbildung 1: Modell einer pRBC mit „knob“ und PfEMP-1-Expression sowie verschiedene endotheliale Liganden (nach Borst et al. 1995)

2.2.5. HIV und Malaria

Plasmodium falciparum Malaria und HIV-Infektion sind zwei der bedeutendsten Infektionskrankheiten in Sub-Sahara Afrika. Schätzungsweise 14 Millionen Menschen im südlich der Sahara gelegenen Teil Afrikas sind HIV positiv. Mindestens 500 Millionen Afrikaner infizieren sich jährlich mit Malaria (Hoffmann et al. 1999).

Mit Co-Infektionen kann auf Grund der hohen Prävalenz beider Erkrankungen regelmäßig gerechnet werden (Ter Kuile et al. 2004). Eine Interaktion mit multifaktoriellem Charakter scheint zwischen beiden Erkrankungen zu existieren (Xiao et al. 1998).

Die an der Abwehr von Malaria beteiligten Immunsysteme und -mechanismen wie das B-Zellsystem, dessen Antikörperproduktion und die T-Zellen, die Zytokine produzieren und die Antikörperbildung unterstützen, sind in frühen Stadien der HIV-Infektion beeinträchtigt und verschlechtern sich mit fortschreitender Erkrankung (Chandramohan und Greenwood 1998, French und Gilks 2000).

Die Immunsystemaktivierung ist ein wichtiger Faktor in der Progression der HIV-Infektion zu AIDS. Eine effiziente Virusreplikation und der Einbau des Virusgenoms in die Wirts-DNS findet nur in aktivierten Zellen statt, welche vorwiegend CD 4 positive T-Lymphozyten sind (Xiao et al. 1998).

Verschiedene Infektionskrankheiten wie Tuberkulose, Herpes simplex Virusinfektion, bakterielle Pneumonie führen zu erhöhter HIV-1-Konzentration im Plasma von Infizierten. Dabei wird die erhöhte Virusreplikation wahrscheinlich durch proinflammatorische Zytokine wie TNF α , Interleukin 1 und 6, die auch bei Malariainfektion verstärkt gebildet werden, und durch die Aktivierung von CD 4 positiven T-Zellen verursacht (Hoffmann 1999).

In der Literatur werden deshalb zwei Hypothesen diskutiert:

a) Reduziert die HIV-Infektion die Immunität auch gegenüber Malaria, was sich anhand häufigerer asymptomatischer sowie schwererer/symptomatischer Infektionen und höheren Parasitendichten manifestieren würde?

Gezeigt werden konnte dies bei HIV infizierten Multigravidae in Malawi mit schwangerschaftsassoziierter Malaria. Diese wiesen im Durchschnitt höhere Parasitämieraten/Parasitämieprävalenz und -geometrische Mittel der Parasitendichte auf (Chandramohan und Greenwood 1998) und besaßen somit eine verminderte Fähigkeit die Parasitämie zu limitieren (French und Gilks 2000). Normalerweise geht bei zuvor klinisch immunen Frauen mit schwangerschaftsassoziierter Malaria diese Immunität durch die Selektion eines neuen Parasitenklons, der befähigt ist an das Plazentagewebe zu binden (über Chondroitin Sulphat A, Hyaluronsäure) verloren. Diese Immunität wird bei der zweiten und folgenden Schwangerschaften durch die Bildung von bindungsblockierenden Antikörpern wiederhergestellt. HIV positive Schwangere können diese Antikörper nicht bilden. Die Immunität wird nicht wiedererlangt (Good et al. 2004).

An Hand einer klinischen Studie in Entebbe/Uganda konnten vermehrte erstmalige Malariafiebertagen und die Tendenz zu größerer Parasitendichte bei an Malaria bzw. Fieber erkrankten HIV positiven Patienten mit verstärkter Immunsuppression/erniedrigter CD-4-Zellzahl gezeigt werden (French und Gilks 2000). Andere Studien fanden keine Unterschiede in der Prävalenz von Parasitämien, Parasitendichte sowie in der Antikörperproduktion gegen *P. falciparum* zwischen HIV-Positiven und HIV negativen Kontrollen. Es fand sich keine signifikante Korrelation zwischen HIV-Status und Dysfunktion des Immunsystems bei der Malariaabwehr (Butcher 1992, Chandramohan und Greenwood 1998, Kashamuka et al. 2003).

b) Führt Malaria zu einer verstärkten HIV-Infektions- und Erkrankungsprogression?

Es konnte gezeigt werden, dass die HIV-Plasmakonzentration in Malariapatienten vor Therapiebeginn signifikant höher war als in der nicht malariainfizierten Kontrollgruppe, ebenso verhielt sich die TNF- α -Konzentration. Eine medikamentöse Malaria-therapie führte zur signifikanten Reduktion der Virusreplikation (Hoffmann et al. 1999). In vitro Studien zeigen, dass das Malariaantigen eine Immunaktivierung und die Zytokinproduktion (TNF α und Interleukin 6) induziert. Beide Mechanismen, d. h. die Immunaktivierung und der Tumornekrosefaktor α , können die HIV-1-Replikation steigern (Xiao et al. 1998).

2.3. Milzfunktion und Malaria im Tiermodell

Es wurde versucht die natürliche humane *Malaria tropica* anhand von verschiedenen Tiermodellen und Plasmodienspezies zu rekonstruieren. Im Folgenden soll eine Zusammenfassung der zwei am häufigsten verwendeten Modelle abgehandelt werden.

2.3.1. Milzfunktion und Malaria im Nagermodell

Plasmodieninfektionen anhand von Nagermodellen sind die wohl am weitläufigsten genutzten Modelle für die menschliche Erkrankung. Dennoch ist die Pathologie der Nagermalaria sehr heterogen. Man weiß wenig über deren pathologischen Grundlagen. Wichtig für das Krankheitsprofil scheinen aber der Wirt und die Spezies zu sein (Nahrevanian und Dascombe 2001).

Zwei der am häufigsten gebrauchten Spezies sind *Plasmodium berghei* und *Plasmodium c. chabaudi*. *Plasmodium berghei* ist ein großer Parasit der vorwiegend Retikulozyten aber auch reife Erythrozyten befällt und fast immer letal verlaufende Infektionen hervorruft. *Plasmodium c. chabaudi* ist im Gegensatz dazu ein eher kleiner Parasit der reife Erythrozyten befällt und nur bei hochvirulenten „strains“ tödlich verlaufen kann (Nahrevanian und Dascombe 2001). Der Vermehrungszyklus dieser Malariaparasiten unterteilt sich ebenfalls in eine ca. 40 bis 68 Stunden dauernde präerythrozytäre Phase, gefolgt von mehreren intraerythrozytären Phasen mit einer Replikationszeit von 24 Stunden.

Klinische Veränderungen während der Infektion sind Splenomegalie durch Hyperplasie der weißen Pulpa, exzessive Anämie und erhöhte Erythropoese (Nahrevanian und Dascombe 2001).

Abwehrmechanismen der Infektion involvieren B-Lymphozyten und Antikörperproduktion, T-Lymphozyten, Makrophagen, Zytokine und andere lösliche Mediatoren. Die Produktion von NO und anderen reaktiven Stickstoffintermediaten (RNI) durch Makrophagen scheint hierbei auch eine Rolle zu spielen, wie sich an Untersuchungen über deren Konzentrationen in verschiedenen Geweben bei unterschiedlich schweren Malariainfektionen gezeigt hat.

Dabei können NO und dessen Intermediate in potentiell tödlich verlaufenden Infektionen mit *P. berghei* weder die Infektion, die Parasitämie noch deren Vermehrung kontrollieren, in nicht letalen Infektionen mit *P. c. chabaudi* aber effektiv sein (Nahrevanian und Dascombe 2001).

Hypothetisch gesehen ist auch der Ort der NO- und RNI-Produktion von Bedeutung, so dass die Konzentration im Blut und in der Milz wichtig für die Erkrankungskontrolle ist. Die Konzentration in Leber und Gehirn ist dagegen eher für die Pathologie der Erkrankung wichtig (Nahrevanian und Dascombe 2001).

Die Antikörperproduktion durch B-Lymphozyten ist eine der effektivsten Abwehrmechanismen gegen die Malariainfektion. Dabei zeigt sich in der experimentellen *P. c. chabaudi*-Erstinfektion zunächst eine unspezifische Erstreaktion gekennzeichnet durch polyklonale B-Zellaktivierung. Es werden zunächst alle Immunglobulin-G-Isotypen produziert jedoch mit vorherrschenden IgG 2a/IgG 3. Zusätzlich ist IFN γ erhöht welches von den vorherrschenden TH-1-Zellen (CD 4 +/CD 45 RB high) produziert wird.

Bei Re-Infektion kommt es zur spezifischen Antwort, die vorwiegend auf den IgG-1-Isotyp beschränkt ist. Dabei ist die Konzentration von IL 4, welches von den hauptsächlich vorkommenden TH-2-Zellen (CD 4 +/CD 45 RB low) produziert wird hoch. Es kommt also in diesem Infektionsmodell je nach Infektionsmodus zum T-Helferzell-„switch“, sowie durch diesen getriggert, zum Immunglobulin-G-Isotypenwechsel (D'Imperio Lima et al. 1996).

Dieser Mechanismus ist wichtig für die Parasitenclearance und scheint auch für eine verminderte wirtschonende inflammatorische Reaktion während der zweiten Antwort verantwortlich zu sein (Bordmann et al. 1997), da insgesamt weniger spezifische Antikörper gebildet werden, IgG 1 kein Komplement aktiviert bzw. keinen Fc-Rezeptor bindet und insgesamt weniger Zytokine gebildet werden (zytotoxische Immunität) (D'Imperio Lima et al. 1996).

Anhand experimenteller *P. berghei*-Infektionen konnte gezeigt werden, dass die Milz eine wichtige Rolle in der ersten Immunabwehr sowie bei der Bildung des immunologischen Gedächtnisses spielt (Weiss et al. 1985). So vollzieht sich die Peripherialisierung der Immunantwort erst Monate nach der Splenektomie und kann auch nur durch ständige Wiederstimulation aufrechterhalten, bzw. einmal verloren, ohne Milz nicht wiedererlangt werden. Jedoch gibt es in Abwesenheit der Milz die Möglichkeit, dass sich in der Leber ähnliche Zellformationen wie in der Milz, so genannte Pseudofollikel, bilden. Diese wurden bei allen Tieren nach Splenektomie mit erhaltener Immunität oder chronischen Infektionen nachgewiesen und dienen somit vorwiegend der zweiten Immunantwort (Weiss et al. 1985).

Insgesamt wurde anhand der verschiedenen Nagermodelle die Wichtigkeit der Milz in der Abwehr von Malariainfektionen gezeigt. Splenektomierte Mäuse beispielsweise wiesen verlängerte, erhöhte Parasitämien bis hin zum kompletten Verlust zuvor erworbener Immunität auf (Engwerda et al. 2005).

Das Nagermodell lässt sich dennoch nur annäherungsweise auf die menschliche, natürliche *P. falciparum*-Infektion übertragen, da verschiedene Spezies verwendet werden, die unterschiedlich reife Erythrozyten befallen. Zusätzlich wird experimentell teilweise nur ein „strain“ verwendet, wohingegen in der Natur immer verschiedene beteiligt sind. Deshalb kann im Gegensatz zu den Experimenten therapeutisch meist keine sterile Immunität erzielt werden (D'Imperio Lima et al. 1996). Dazu kommt, dass die Maus im Gegensatz zum Menschen eine nichtsinusoidale Milz besitzt.

2.3.2. Milzfunktion und Malaria im Affenmodell

Im Affenmodell werden ebenfalls verschiedene Plasmodienspezies wie z. B. *Plasmodium knowlesi*, *Plasmodium falciparum* und *Plasmodium cynomolgi* verwendet.

P. knowlesi-Infektionen des Rhesusaffen haben einen ähnlich schweren Verlauf wie *P. falciparum*-Infektionen des Menschen. Sie verlaufen gewöhnlich fatal oder gehen, wenn medikamentös therapiert, meist in einen chronischen Zustand über (Barnwell et al. 1983).

P. knowlesi exprimiert während des asexuellen Zyklus ebenfalls spezifische Antigene (genannt SICA) an der Oberfläche infizierter Erythrozyten, die einen wichtigen Faktor für die Zytoadhärenz darstellen und auch antigene Variation durchmachen (Barnwell et al. 1983). Es konnte nun gezeigt werden, dass es nach Transfer von *P. knowlesi*-Populationen von milzgesunden Affen in Splenektomierte zu einer Veränderung der exprimierten Oberflächenproteine kommt. Das SICA-Antigen verschwindet und die in vivo Sequestrationsfähigkeit geht verloren (Barnwell et al. 1983). Dieses Phänomen war nach Re-Transfer der Parasiten von diesen milzlosen Affen in milzgesunde Affen reversibel. Das führte zu der Annahme, dass die Milz eine wesentliche Rolle bei der Expressierung von Oberflächenantigenen spielt und dies die Zytoadhärenz beeinflusst.

P. cynomolgi-Infektionen zeigten nach Transfer von Parasiten von Splenektomierten in milzgesunde Affen eine reduzierte Virulenz in diesen Milzgesunden. Jedoch blieb bei Subinokulation von Splenektomierten in wiederum Splenektomierte die parasitäre Virulenz unbeeinflusst (Schmidt et al. 1987). Die Milz scheint also essentiell für die Entfaltung von attenuierten Parasiten zu sein, da diese Parasiten sehr anfällig für die Milzclearance sind (Schmidt et al. 1987).

P. falciparum vermehrt sich am besten im Menschen, kann aber auch an Primaten adaptiert werden. In *P. falciparum*-Infektionen trat in splenektomierten Affen bei Primarinfektion höhere und verlängerte Parasitämie auf als in milzgesunden Affen. Die Infektionen mussten medikamentös behandelt werden, wurden aber komplett überwunden (Pye et al. 1994, Carvalho et al. 2003). Bei Sekundärinfektion mit dem homologen „strain“ zeigte sich keine sterile Immunität in Splenektomierten im Gegensatz zu Milzgesunden. Die Parasitämie war geringer als bei Erstinfektion, und es wurde niemals eine schwere Malaria beobachtet. Man kann davon ausgehen, dass diese splenektomierten Affen eine Immunität entwickeln, die, unabhängig von der Milz, aber weniger effektiv ist (Pye et al. 1994). Außerdem wurden im peripheren Blut von splenektomierten Schimpansen und Menschen mit *P. falciparum*-Infektion Schizonten gefunden, welche gewöhnlich in der peripheren Zirkulation von Milzgesunden selten zu finden sind (Barnwell et al. 1983). Die Milz scheint damit auch von größter Wichtigkeit bei der Abwehr von Malariainfektionen im Affen zu sein.

2.4. Die Funktion der Milz in der humanen Plasmodieninfektion

Die Funktion der Milz in *Malaria tropica* ist noch nicht abschließend geklärt (Cook 1998). Wahrscheinlich trägt die Milz durch verschiedene Mechanismen zur Abwehr von akuten Infektionen aber auch zur Unterhaltung dieser bei (Whyler 1983).

Ein wesentlicher Faktor dabei ist die mechanische Filtration von parasitierten, weniger deformierbaren Erythrozyten. Dies integriert sowohl Einfangen und Eliminieren ganzer Erythrozyten, als auch das Entfernen von Parasiten aus den roten Blutzellen, wenn sich diese durch die Schlitze der Sinusoide bewegen (Styrt 1990, Looareesuwan et al. 1987/1993, Ramasamy 1998). Ein weiterer Faktor ist die Fc-Rezeptor vermittelte Clearance.

An parasitierte Erythrozyten binden Antikörper gegen parasitäre- oder Neoantigene, die bei einer Infektion auf der Erythrozytenoberfläche exprimiert werden. Diese interagieren mit dem Fc-Rezeptor von Makrophagen/MPS-Zellen (Opsonisierung) und erleichtern damit die Phagozytose (Ho et al. 1990). Phagozytierende Zellen der Milz sind polymorphkernige Leukozyten, Endothel auskleidende Zellen, retikuläre Zellen und mononukleäre Zellen/Makrophagen. Diese nehmen sowohl infizierte als auch nicht infizierte rote Zellen auf (Pongponratn et al. 1989). Die Milz stellt also eine spezifische Umgebung bereit, in der die Zellen des Immunsystems miteinander in Verbindung treten können mit dem Ziel, die akute Infektion durch Antigenpräsentation, Aktivierung von B- und T-Lymphozyten, Antikörperproduktion, Phagozytose und Mediator-/Zytokinproduktion zu kontrollieren (Styrt 1990). Die Milz greift ebenso modulierend in die mikrobielle Virulenz ein. Sie scheint Einfluss auf die Expression von Oberflächenantigenen auf der Membran von parasitierten Erythrozyten, endothelialen Rezeptoren und damit auf die Zytoadhärenz zu haben (Wyler 1983, Styrt 1990). Dies könnte dazu führen, dass der Parasit durch Exprimierung von zytoadhärenzfördernden Antigenen die Möglichkeit hat, die spezifische Abwehr der Milz zu umgehen, was ihm einen Überlebensvorteil verschafft.

2.5. Folgen der Splenektomie auf die Malaria tropica-Infektion

Insgesamt existieren nur wenige Informationen über die Auswirkung der Splenektomie auf die Malaria tropica Infektion bzw. deren klinischen Verlauf. Verschiedene Berichte aus tropischen Regionen sind zum Teil kontrovers. Sie sprechen einerseits von erhöhter Parasitämie, verminderter Sequestration, verzögerter Parasitenclearance, erhöhter Inzidenz und Schwere der Erkrankung in Menschen ohne Milz (Maharaj et al. 1987, Styrt 1990, Looareesuwan et al. 1993, Boone und Watters 1995, Pongponratn et al. 2000, Chotivanich et al. 2002). Besonders wichtig im Rahmen dieser Untersuchung ist hierbei die erstmalige Beobachtung von reifen/späten Parasitenstadien im peripheren Blut eines Splenektomierten (Israeli 1987). Im Gegensatz dazu wurden aber auch nahezu normale Clearancewerte, Sequestration und keine späten parasitären Entwicklungsstufen in Splenektomierten beobachtet (Ho et al. 1992, Looareesuwan et al. 1993). Die Progressivität der Erkrankung und das Ansprechen auf konventionelle Chemotherapie scheint ebenfalls unbeeinflusst zu sein (Styrt 1990).

3. Ziele der Arbeit

Methodenetablierung:

Es sollte die Methode zur Altersbestimmung von *Plasmodium falciparum* im peripheren Blut und deren Durchführung beschrieben, statistisch validiert und diskutiert werden.

Parasitämie:

Es sollte die Frage beantwortet werden, ob es während des Beobachtungszeitraumes in der Kohorte Unterschiede in der Häufigkeit des Auftretens von Parasitämien zwischen Splenektomierten und Kontrollen gibt.

Des weiteren sollte geklärt werden, ob die Höhe der Parasitämie einen Einfluss auf das Vorkommen älterer Parasitenstadien im peripheren Blut hat und ob dies abhängig vom Milzstatus ist.

Vorkommen älterer Parasitenstadien:

Es sollte untersucht werden, in welchen Untersuchungsgruppen sich ältere Parasitenstadien im peripheren Blut nachweisen lassen und ob man daraus schließen kann, dass die Milz bzw. die Splenektomie Einfluss auf die Altersstruktur von *Plasmodium falciparum* im peripheren Blut hat.

Einfluss anderer Faktoren:

Es sollte anhand der HIV-Malaria-Co-Infektion besprochen werden, ob es andere Einflussfaktoren auf das Vorkommen von Parasiten bzw. deren Alterstruktur im peripheren Blut gibt.

Schwere der Erkrankung:

Es sollte untersucht werden, ob es Unterschiede in der Schwere der Erkrankung zwischen Milzlosen und Menschen mit Milzgewebe gibt und ob diese in Zusammenhang zu dem Vorkommen älterer Parasitenstadien im peripheren Blut gebracht werden können.

4. Material und Methoden

4.1. Studiendesign

Es handelt sich um eine prospektive kontrollierte Kohortenstudie, die von Januar 1999 bis Februar 2000 in Malawi/Ostafrika, d. h. einem Malaria-tropica-Endemiegebiet durchgeführt wurde.

Zunächst wurde versucht, anhand von Patientenakten aus den 3 Zentralkrankenhäusern Malawis (Queen Elisabeth Central Hospital Blantyre, Lilongwe Central Hospital, Zomba Central Hospital) alle Fälle zu identifizieren, die aufgrund einer traumatischen Milzruptur operiert wurden. Dabei ließen sich 116 solcher Fälle identifizieren. Nachfolgend wurde versucht neben dem Namen auch die Adressen dieser Personen ausfindig zu machen, was bei 65 Personen gelang. Mit 43 Patienten konnte in ihren Heimatdörfern persönlicher Kontakt aufgenommen und sie für die Teilnahme an der Studie gewonnen werden.

Es waren 33 Splenektomierte (E) und 10 milzerhaltend Operierte (R). Diese Patienten kamen zwischen Januar 1995 und Juni 1999 zur Operation.

Während der ersten Visite wurde sogleich eine Kontrolle für jeden Patienten, gematcht nach Alter, Geschlecht und sozialem Status (gewöhnlich ein Verwandter), bestimmt.

Die in die Studie eingeschlossenen Splenektomierten, Kontrollen und milzerhaltend Operierten wurden über den oben genannten Zeitraum monatlich hinsichtlich Malaria-symptomen befragt und untersucht. Dabei wurden bei jeder Konsultation 3 Blutproben, je 3 dünne Blutaussstriche und 2 Dicke Tropfen zur Analyse gewonnen.

Die bei den Konsultationen gewonnenen Ausstrichsets, erhielten eine Codenummer, um zu gewährleisten, dass bei der mikroskopischen Altersbestimmung nicht bekannt war aus welcher Gruppe (Splenektomierte, Kontrollen, milzerhaltend Operierte) die jeweiligen Ausstriche stammten.

4.2. Untersuchungsmaterial

4.2.1. Malaria

Von den Patienten wurden bei jeder Konsultation aus Blut der Fingerbeere jeweils 3 dünne Ausstriche auf staub- und fettfreiem Objektträger mit Deckgläschen und 2 Dicke Tropfen gewonnen. Die dünnen Ausstriche wurden luftgetrocknet und mit Methanol fixiert, die Dicken Tropfen nur luftgetrocknet. Alle dünnen Ausstriche und Dicken Tropfen wurden mit Giemsa gepuffert auf pH 7,2 für 45 Minuten gefärbt (modifiziert nach Cook 1998).

4.2.2. HIV

Von jedem Patienten wurden jeweils 3 venöse Blutproben entnommen und dabei die 3. Probe in ein Serumröhrchen (Sarsted Monovetten®) gefüllt. Im Labor des Zomba Zentralkrankenhauses wurde nachfolgend das Serum abzentrifugiert und bei -20 °C tief gefroren. Der Transport der gefrorenen Serumproben nach Deutschland erfolgte bei einer Temperatur von unter -3 °C. Aus diesen gefrorenen Serumproben führte das Institut für Medizinische Mikrobiologie der Universitätsklinik Jena die HIV-Tests durch.

4.3. Analyse des Untersuchungsmaterials

4.3.1. Malaria

Alle mikroskopischen Untersuchungen fanden unter 1000-facher Vergrößerung in Ölimmersion statt.

a) Semiquantitative Analyse

Nach der Speziesbestimmung wurde, um einen Überblick über die für die Studie relevanten, parasitärischen dünnen Ausstriche und Dicken Tropfen zu bekommen, zunächst eine semiquantitative Analyse von erfahrenen Labortechnikern nach der in der malawischen Routinediagnostik üblichen Verfahrensweise am ZCH durchgeführt. Diese trifft folgende Aussagen (Tabelle 1):

Tabelle 1: Aussagen der Routinediagnostik für Malaria in Malawi, semiquantitative Analyse zur Beurteilung der Parasitendichte im Dicken Tropfen, 1000-fache Vergrößerung in Ölimmersion

MP -	keine Parasiten in 100 high power fields (HPF)
MP +	1-9 Parasiten in 100 HPF
MP ++	11-99 Parasiten in 100 HPF oder 1-9 Parasiten in 10 HPF
MP +++	1-9 Parasiten pro 1 HPF
MP ++++	10-99 Parasiten pro 1 HPF
MP +++++	≥ 100 Parasiten pro 1 HPF

(MP: Malariaparasit; HPF: high power field/1000-fache Vergrößerung in Ölimmersion)

b) Quantitative Analyse

Da die Stadienbestimmung im dünnen Ausstrich bei hohen Parasitämien qualitativ hochwertiger ist, wurde die Parasitämie zunächst im dünnen Ausstrich in 500 roten Blutzellen (RBC) bestimmt. War die gefundene Parasitenzahl zu niedrig (≥ 5 Parasiten) oder ließen sich keine Parasiten nachweisen, erfolgte die Auszählung der Parasiten gegen 1000 RBC und nachfolgend bei negativem Ergebnis gegen 200 bzw. 500 weiße Blutzellen (WBC) ausgezählt (vgl. Silamut und White 1993).

War die Parasitendichte im dünnen Ausstrich zu gering, d. h. wurden nach 1 Stunde keine Parasiten gefunden oder war die Qualität der Ausstriche zu schlecht, wurde der korrespondierende Dicke Tropfen genutzt.

Im Dicken Tropfen wurde die Parasitämie zunächst in 200 WBC bestimmt (vgl. Silamut und White 1993). blieb die Parasitämie zu niedrig (≤ 5 Parasiten) oder wurden dabei keine Parasiten gefunden, erfolgte die Auszählung der Parasiten gegen 500 WBC.

Nachfolgend fand die Altersbestimmung der Plasmodium falciparum Parasiten statt. Dazu wurden die Parasiten in die unten aufgeführten Stadien eingeteilt (Abbildungen 2 bis 7 aus Lehmanns medizinische Atlanten und eigene Fotos der entsprechenden Stadien). Die Stadieneinteilung erfolgte dabei modifiziert nach Abbildungen aus medizinischen Atlanten und der in anderen Studien verwendeten Einteilung (Neuman und Mayer 1914, Silamut und White 1993).

- | | |
|-----------|--|
| Stadium 1 | Frühe Ringform (early ring, dünnes Zytoplasma \leq Kern) |
| Stadium 2 | Spätere Ringform (later ring, zwischen früher und später Ringform, Zytoplasmagröße ungefähr der 2-fachen Kerngröße entsprechend) |
| Stadium 3 | Später Ring (late ring, dickes Zytoplasma ungefähr der 3-fachen Kerngröße entsprechend, kein Pigment) |
| Stadium 4 | Früher Trophozoit (early troph, kleiner Parasit mit wenig Pigment) |
| Stadium 5 | Später Trophozoit (late troph, größerer Parasit, voll mit Pigment) |
| Stadium 6 | Schizont (schizont, fragmentierte Kernstruktur) |

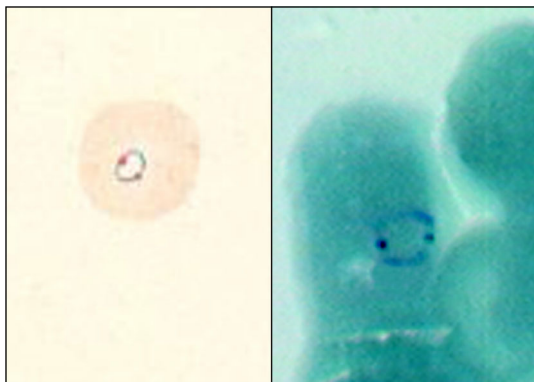


Abbildung 2: P. falciparum, Stadium 1

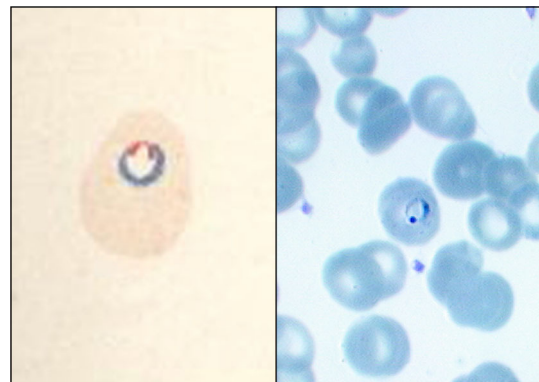


Abbildung 3: P. falciparum, Stadium 2

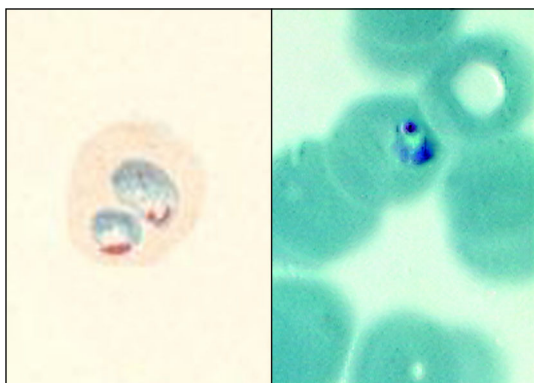


Abbildung 4: P. falciparum, Stadium 3

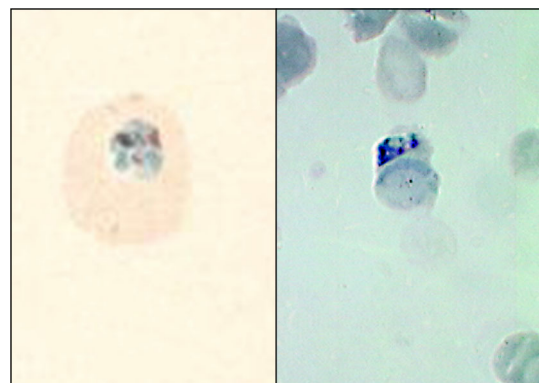


Abbildung 5: P. falciparum, Stadium 4

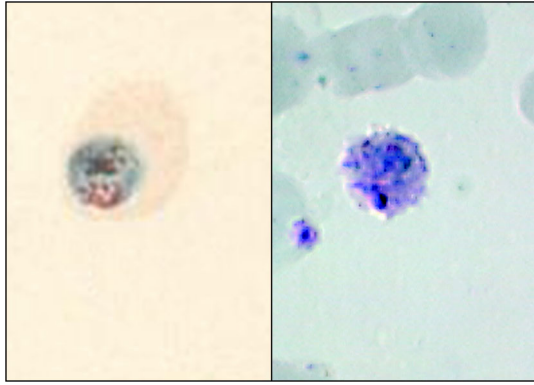


Abbildung 6: *P. falciparum*, Stadium 5

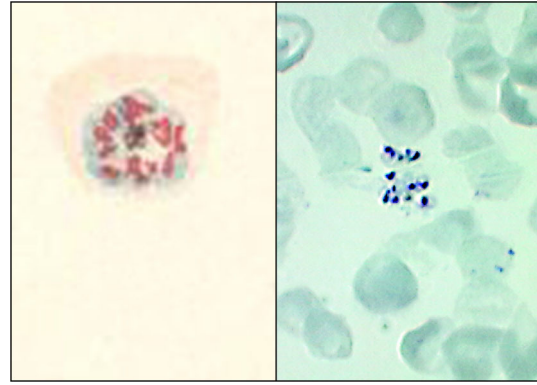


Abbildung 7: *P. falciparum*, Stadium 6

Die Parasiten wurden im dünnen Ausstrich gezählt, bis 100 Stück der oben genannten Stadien klassifiziert oder 2 Stunden vergangen waren. Wurden die genannten Kriterien nicht erfüllt, wurde auf den korrespondierenden Dicken Tropfen zurückgegriffen und die Parasitenstadien darin klassifiziert, bis entweder 100 Stück bestimmt oder 2 Stunden vergangen waren (vgl. Silamut und White 1993, hier wurden 100 Parasiten klassifiziert).

In Ausstrichen mit hoher Parasitämie (vgl. auch semiquantitative Analyse MP ++/+++) wurde die Altersbestimmung getrennt nach der Parasitämiezählung durchgeführt.

Um auch die niedrigparasitämischen Ausstriche in einem angemessenen Zeit- und Arbeitsaufwand auswerten zu können, wurden bei Ausstrichen mit niedriger Parasitenanzahl (vgl. auch Semiquantitative Analyse MP +) Altersbestimmung und Parasitämiezählung begrenzt auf 1 Stunde kombiniert vorgenommen.

4.3.2. HIV

Die Serumproben wurden aufgetaut und mittels automatisiertem ELISA der Firma Behring auf HIV-Antikörper untersucht. Dabei wurde das Patientenserum nach dem Sandwich-Prinzip mit HIV-Antigen aus infizierten Lymphozytenzelllinien und nachfolgend mit enzymmarkiertem Immunglobulin G spezifisch für die HIV-Antikörper und Enzymsubstrat inkubiert. Ein positiver Test zeigte sich anhand eines Farbumschlags durch die Enzymreaktion (Burkard 1992).

Die Durchführung des HIV-Testes erfolgte bei 72 von 76 Personen mindestens einmal.

4.4. Schweregrade der Malaria

Zur Kategorisierung der klinischen Befunde wurde die Malaria in folgende Schweregrade eingeteilt:

- Asymptomatische Parasitämie = P (parasitaemia)
 - keine Klinischen Symptome oder Beschwerden
- Residualparasitämie = RP (residual parasitaemia)
 - wahrscheinliche Malariasymptome innerhalb des letzten Monats
- Wahrscheinliche Malaria = MM (most likely malaria)
 - wahrscheinliche Malariasymptome im Moment
 - trockener Husten
 - Kopfschmerz
 - Nackenschmerz
 - abdominale Beschwerden ohne Diarrhoe
 - Abgespanntheit
- Bewiesene Malaria = PM (proven malaria)
 - wahrscheinliche Malariasymptome wie axilläre Temperatur $> 37^{\circ}\text{C}$
- Schwere Malaria = SM (severe malaria)
 - nach WHO Kriterien definiert
 - Normozytäre Anämie, $\text{HK} < 15 \%$, $\text{HB} < 5\text{g/dl}$
 - RR systolisch $< 70\text{ mmHG}$ bei Erwachsenen, $< 50\text{ mmHG}$ bei Kindern
 - Hämoglobinurie/Hämaturie
 - akutes Nierenversagen
 - Lungenödem/ARDS
 - Hypoglykämie, Blutglucose $< 2,2\text{ mmol/l}$
 - spontane Blutungen
 - generalisierte Anfälle, > 2 in 24 Stunden
 - Azidose, arterieller pH $< 7,25$, Plasmabikarbonat $< 15\text{ mmol/l}$

4.5. Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung wurde mit den Softwarepaketen SPSS[°] 10.0.7 (SPSS[°] Inc. 1989-1999) bzw. SPSS[°] 12.0.1 durchgeführt.

4.6. Votum der Ethikkommission

Die Ethik- und Forschungskommission des Gesundheitsministeriums Malawis genehmigte die Studie vor Beginn unter Verweis auf HSRC/10/98 am 02.04.1998 (betreffendes Schreiben siehe Anhang).

Alle teilnehmenden Personen stimmten nach Aufklärung über das Anliegen der Studie und der Beschreibung der damit verbundenen klinischen- und laborchemischen Untersuchungen sowie unter dem Hinweis, dass ein Austritt aus der Studie jederzeit möglich ist, dem Einschluss in die Studie mit ihrer Unterschrift bzw. einem Fingerabdruck auf dem Erhebungsbogen (siehe Anhang) zu.

5. Ergebnisse

5.1. Beschreibung der Patientengruppen

Das Patientenkollektiv setzt sich aus 33 Splenektomierten (E) sowie 33 Kontrollen (C) und 10 milzerhaltend Operierten (R) zusammen (Tabelle 2).

Die Splenektomierten und Kontrollen bilden dabei gematchte Paare. Sie gleichen sich weitgehend in Alter, Geschlecht, körperlichen Merkmalen und sozialem Status (Tabellen 3 bis 5).

Das sind insgesamt 43 von 116 klinischen Fällen (37 %), die zwischen Januar 1995 und Oktober 1999 an den 3 Zentralkrankenhäusern Malawis auf Grund einer traumatischen Milzruptur, operativ behandelt wurden. Die 33 Splenektomierten entsprechen 28,45 % aller 116 operativ behandelten Patienten. Die 10 milzerhaltend Operierten entsprechen 8,62 % aller 116 operativ behandelten Patienten.

Tabelle 2: Patientengruppen

Patientengruppe	Symbol	Anzahl
Splenektomien	E	33
Kontrollen	C	33
Milzerhaltend Operierte	R	10

Tabelle 3: Alters- und Geschlechtsverteilung innerhalb der Gruppen

	E (n = 33)	%	C (n = 33)	%	R (n = 10)	%
Geschlecht w/m	8/25	24/76 %	9/24	18/72 %	1/9	10/90 %
Alter Mittelwert (range)	24,2 (6 – 70)		24,2 (6 – 55)		29,8 (14 – 48)	

(E: Splenektomien; C: Kontrollen; R: milzerhaltend Operierte/repairs; n: Anzahl, m: männlich; w: weiblich)

Tabelle 4: Konstitutionelle Parameter innerhalb der Gruppen

Parameter	E (n = 33)	C (n = 33)	R (n = 10)
Gewicht in kg			
Mittelwert	48,6	53,9	56
(range)	(20 – 75)	(18 – 82)	(30 – 80)
Größe in cm			
Mittelwert	155	157	165
(range)	(115 – 179)	(117 – 185)	(141 – 178)

(E: Splenektomien; C: Kontrollen; R: milzerhaltend Operierte/repairs; n: Anzahl)

Tabelle 5: Tätigkeiten/Berufe innerhalb der Gruppen

Tätigkeit/ Berufe	E (n = 33)	%	C (n = 33)	%	R (n = 10)	%
Schüler	17	51 %	15	45 %	3	30 %
Bauern	7	21 %	12	36 %	4	40 %
Angestellte	4	12 %	4	12 %	0	0 %
Fischer	0	0 %	0	0 %	1	10 %
Lehrer	2	9 %	0	0 %	0	0 %
Pastor	0	0 %	0	0 %	1	10 %
Hausfrauen	0	0 %	1	3 %	0	0 %
Prostituierte	1	3 %	0	0 %	0	0 %
Senioren	2	6 %	1	3 %	1	10 %

(E: Splenektomien; C: Kontrollen; R: milzerhaltend Operierte/repairs; n: Anzahl)

Die durchschnittliche Zeitdauer zwischen Milzoperation und Studienbeginn lag bei 360 Tagen (5...921 Tage) in der Gruppe E und bei 799 Tagen (311...1176 Tage) in der Gruppe R.

Die durchschnittliche Hospitalisationsdauer lag bei 13,4 Tagen (5...35 Tage) in der Gruppe E und bei 29,6 Tagen (8...68 Tage) in der Gruppe R.

Während des Untersuchungszeitraumes nahmen Splenektomierte (E) durchschnittlich 7,5 mal an den monatlichen Untersuchungen teil, Kontrollen 7,1 mal.

Um einen weiteren Analyseansatz vornehmen zu können, wurde das Patientenklintel auf dem Ultraschall basiertem Nachweis von Milzgewebe neu verteilt.

Insgesamt wurden von allen 76 Patienten 56 mit Ultraschall untersucht, davon 23 Splenektomierte, 23 Kontrollen und 10 milzerhaltend Operierte.

Bei den verbleibenden 20 Patienten, davon jeweils 10 Splenektomierte und 10 Kontrollen, wurde keine Ultraschalluntersuchung durchgeführt, da sie zu dem Untersuchungstermin nicht erschienen.

Bei 35 Patienten konnte Milzgewebe nachgewiesen werden, davon in 3 Splenektomierten, 23 Kontrollen und 9 milzerhaltend Operierten. Bei 21 Patienten konnte kein Milzgewebe nachgewiesen werden, davon in 20 Splenektomierten, keiner Kontrolle und einem milzerhaltend Operierten.

Daraus ergibt sich folgende neue Gruppeneinteilung: 35 Patienten mit nachweisbarem Milzgewebe (S+) und 21 Patienten ohne nachweisbares Milzgewebe (S-) (Tabelle 6).

Tabelle 6: Gruppeneinteilung basierend auf Ultraschallergebnis

	USS S+	USS S-	Summe USS
E	3	20	23
C	23	0	23
R	9	1	10
Summe	35	21	56

(USS S+: nachweisbares Milzgewebe im Ultraschall; USS S- kein nachweisbares Milzgewebe im Ultraschall, USS: Ultraschalluntersuchung)

5.2. Methodenetablierung

5.2.1. Anzahl und Auswahl der Ausstriche

Insgesamt wurden 2616 Ausstriche während der 14-monatigen Observationsperiode gesammelt. Deren Auswertung erfolgte zunächst mit der semiquantitativen Analyse am Zomba Zentralkrankenhaus.

Daraus ergaben sich 1913 für Plasmodium falciparum negative und 703 positive Ausstriche. In 271 dieser 703 positiven Ausstriche wurde eine Parasitämie bestimmt, das waren 130 Dicke Tropfen und 141 dünne Ausstriche. Diese stammten zum Teil vom selben Untersuchungstermin.

Aus diesen 703 positiven Ausstrichen wurden wiederum 96 Ausstriche für die Altersbestimmung selektiert. Dabei fiel die Auswahl vorwiegend auf hochparasitämische Ausstriche (vgl. semiquantitative Analyse MP ++/+++). Um aber eine relative Gleichheit zwischen den Untersuchungsgruppen herzustellen, wurden auch Ausstriche mit niedrigeren Parasitenzahlen (vgl. semiquantitative Analyse MP +) eingeschlossen.

Um im Folgenden eine statistische Auswertung vornehmen zu können, entsprechen diese 96 parasitämschen oder jemals klassifizierten Ausstriche auch sogenannten „Patientenpunkten“. Der Begriff „Patientenpunkt“ bedeutet, dass jeder Patient im Beobachtungszeitraum mindestens eine auswertbare Parasitämie hatte, jedoch durchaus mehrere Parasitämien gehabt haben kann, die zur Auswertung kamen.

Von diesen 96 Ausstrichen oder „Patientenpunkten“ stammten demnach 63 von Splenektomierten und 33 von Kontrollen (Abbildung 8).



Abbildung 8: Gruppenverteilung aller zur Altersbestimmung genutzten Ausstriche

5.2.2. Aussagekraft der semiquantitativen Analyse

Wie in 4.3.1.a) beschrieben, wurde zunächst eine semiquantitative Analyse durch Labortechniker des Zomba Zentralkrankenhauses vorgenommen. Da diese wesentlich zur Auswahl der zur Parasitämie- und Altersbestimmung genutzten Ausstriche beitrug, soll hier untersucht werden, ob die dabei getroffenen Aussagen mit den von uns gemachten Aussagen hinsichtlich des Parasitenvorkommens und der Parasitenhöhe übereinstimmen.

Dicker Tropfen

Dazu wurden zunächst alle Dicken Tropfen betrachtet, in denen sowohl eine semiquantitative als auch eine tatsächliche quantitative Parasitämiebestimmung vorgenommen wurde. Das waren insgesamt 130 Ausstriche, davon waren 126 laut semiquantitativer Analyse positiv für Malariaparasiten und 4 negativ. Wir hingegen fanden bei der tatsächlichen Parasitämiebestimmung 94 für Malariaparasiten positive und 36 negative Ausstriche (Tabelle 7).

Es wurden also von den Labortechnikern insgesamt mehr Dicke Tropfen als positiv bewertet als von uns.

Tabelle 7: Verteilung der Dicken Tropfen nach semiquantitativem und tatsächlichem Resultat der Parasitenbestimmung in Positive und Negative

	Parasiten positiv	Parasiten negativ	Summe
MP semiquantitativ positiv	92	34	126
MP semiquantitativ negativ	2	2	4
Summe	94	36	130

(MP: Malariaparasiten)

Die Verteilung der Dicken Tropfen nach der Anzahl an „pluses“, die nach der semiquantitativen Methode analysiert wurden, sind in der Tabelle 8 bzw. in der Abbildung 9 zusammengestellt.

Dabei erhielt die Mehrzahl der Dicken Tropfen ein MP + (83,85 %), gefolgt von MP ++ (10,77 %), MP – (3,08 %) und MP +++ (2,31 %). MP ++++/+++++ konnte nicht gefunden werden bzw. diese Ausstriche wurden nicht von beiden Untersuchergruppen/nach beiden Methoden untersucht. Sie gehen daher nicht in diese Bewertung ein.

Tabelle 8: Verteilung der Dicken Tropfen nach semiquantitativem Resultat in „pluses“ und tatsächlichem Resultat der Parasitenbestimmung in Positive und Negative

Semiquantitative Analyse in « pluses »	Parasiten positiv	Parasiten negativ	Summe
MP –	2	2	4
MP +	81	28	109
MP ++	10	4	14
MP +++	1	2	3
Summe	94	36	130

(MP: Malariaparasiten in „pluses“)

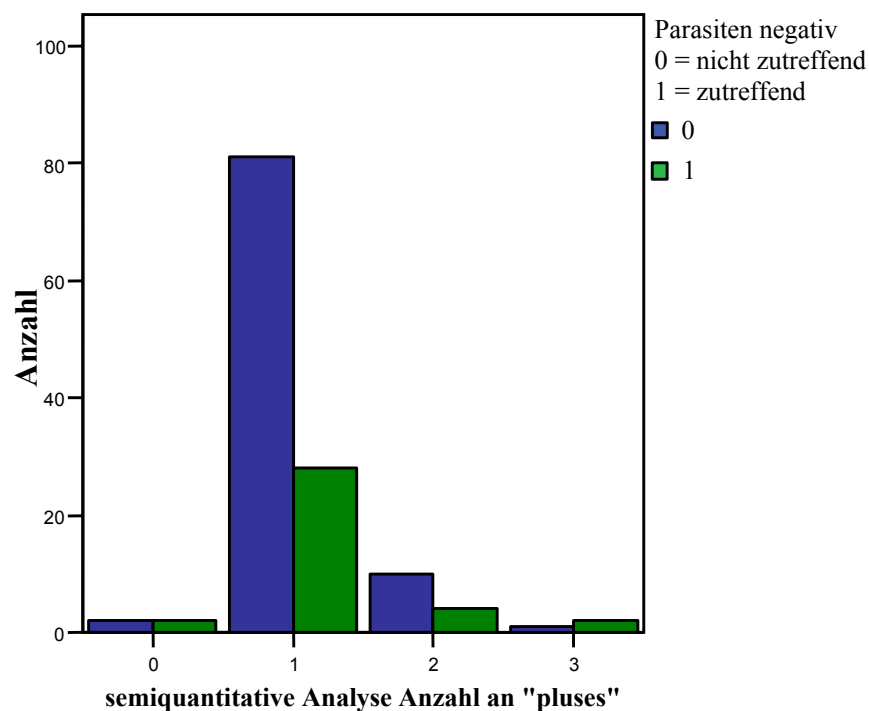


Abbildung 9: Totale Anzahl der Dicken Tropfen nach semiquantitativem Resultat in „pluses“ und Verteilung nach tatsächlichem Resultat der Parasitämiebestimmung

Ergebnis: Weder das Verhältnis von semiquantitativ positiven Ausstrichen und den von uns als malariapositiv bewerteten Dicken Tropfen, noch das Verhältnis der Anzahl an „pluses“ im Dicken Tropfen und den von uns als malariapositiv bewerteten Ausstrichen ist statistisch signifikant (Chi-Quadrat-Test $p > 0,3$). Man kann also bei Vorkommen von „pluses“ nicht auf das tatsächliche Vorkommen von Parasiten im Dicken Tropfen schließen.

Weiterhin soll die Anzahl an „pluses“ mit der von uns ausgezählten totalen Anzahl an Parasiten (Parasitämie in 500 WBC) verglichen werden. Dazu wurde die absolute Anzahl von „pluses“ mit der Parasitämie in 500 WBC korreliert. Dabei zeigen sowohl Spearman- als auch Kendall-Tau-b-Test keine signifikanten Korrelationen ($p > 0,9$).

Mit dem Kruskal-Wallis-Test wurde untersucht, ob es einen signifikanten Unterschied in der tatsächlichen Parasitämiehöhe (Parasitämie in 500 WBC) innerhalb der Gruppen, eingeteilt nach der Anzahl an „pluses“ gibt. Mit einem Ergebnis von $p > 0,4$ kann man sagen, dass es einen signifikanten Unterschied gibt (Abbildung 10). Mit der Anzahl an „pluses“, die in der semiquantitativen Analyse vergeben wurden, lässt sich nur schwer die Parasitämie in 500 WBC abschätzen.

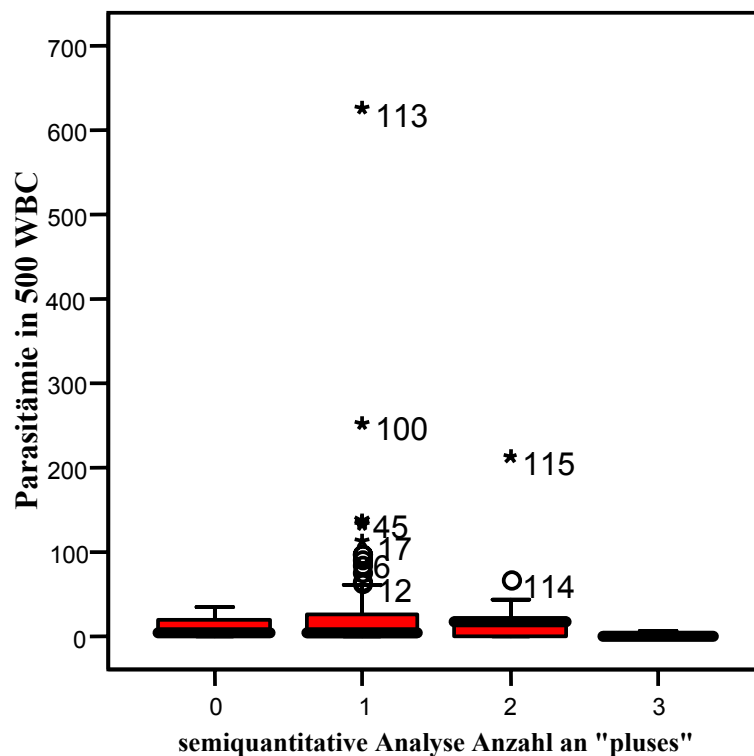


Abbildung 10: Semiquantitative Anzahl an „pluses“ im Verhältnis zur Parasitämie in 500 WBC

dünne Ausstriche

Die semiquantitative Analyse wurde, obwohl unüblich, auch zur Beurteilung des Parasiten-vorkommens bzw. der Parasitendichte im dünnen Ausstrich angewendet.

Hier sollten 141 dünne Ausstriche betrachtet werden, in denen sowohl eine semiquantitative Analyse als auch eine tatsächliche quantitative Parasitämiebestimmung erfolgte. Von diesen 141 dünnen Ausstrichen waren laut semiquantitativer Analyse 89 positiv für Malariaparasiten und 52 negativ. Bei der tatsächlichen Parasitämiebestimmung fanden wir 90 für Malaria-parasiten positive Ausstriche und 51 negative (Tabelle 9).

Tabelle 9: Verteilung der dünnen Ausstriche nach semiquantitativem und tatsächlichem Resultat der Parasitenbestimmung in Positive und Negative

	Parasiten positiv	Parasiten negativ	Summe
MP semiquantitativ positiv	65	25	89
MP semiquantitativ negativ	25	27	52
Summe	90	51	141

(MP: Malariaparasiten)

Die Verteilung der dünnen Ausstriche nach der Anzahl an „pluses“, die nach der semiquantitativen Methode analysiert wurden, ist in Tabelle 10 bzw. Abbildung 11 zusammengestellt.

Dabei erhielt die Mehrzahl der dünnen Ausstriche ein MP + (50, 35 %), gefolgt von MP – (36,88 %), MP ++ (10,64 %) und MP +++ (2,13 %). MP ++++/+++++ wurden nicht gefunden bzw. diese Ausstriche nicht von beiden Untersuchergruppen/nach beiden Methoden untersucht und gehen daher nicht in diese Bewertung ein.

Tabelle 10: Verteilung der dünnen Ausstriche nach semiquantitativem Resultat in „pluses“ und tatsächlichem Resultat der Parasitenbestimmung in Positive und Negative

Semiquantitative Analyse in « pluses »	Parasiten positiv	Parasiten negativ	Summe
MP -	25	27	52
MP +	48	23	71
MP ++	14	1	15
MP +++	3	0	3
Summe	90	51	141

(MP: Malariaparasiten in „pluses“)

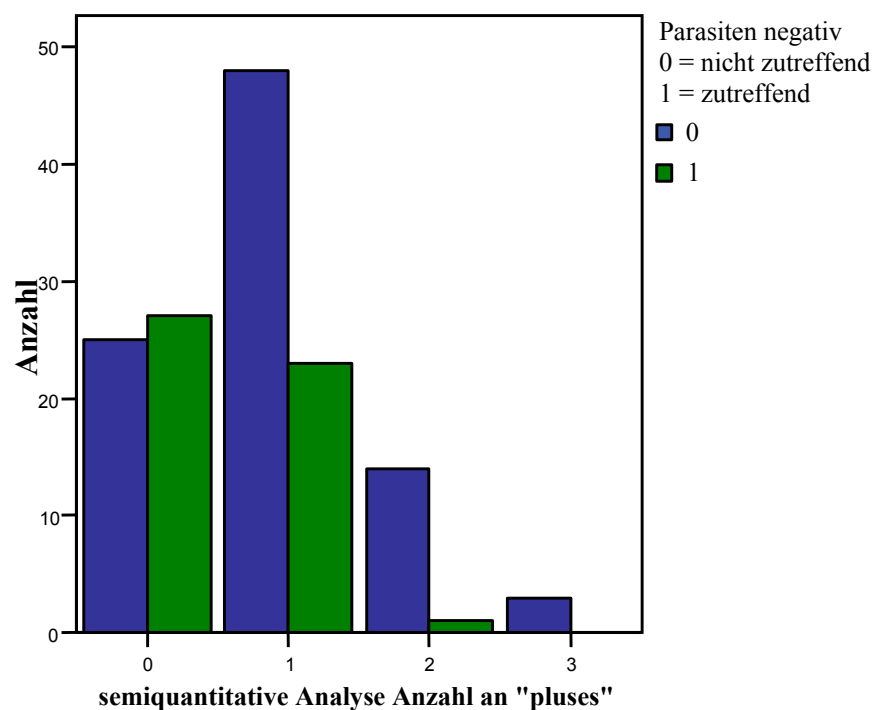


Abbildung 11: Totale Anzahl der dünnen Ausstriche nach semiquantitativem Resultat in „pluses“ und Verteilung nach tatsächlichem Resultat der Parasitärebestimmung

Ergebnis: Sowohl das Verhältnis von semiquantitativ positiven Ausstrichen und den von uns als malariapositiv bewerteten dünnen Ausstrichen, als auch das Verhältnis der Höhe der „pluses“ im dünnen Ausstrich und den von uns als malariapositiv bewerteten Ausstrichen ist statistisch signifikant (Chi-Quadrat-Test $p < 0,01$).

Man kann also bei Vorkommen von „pluses“ im dünnen Ausstrich auch auf das tatsächliche Vorkommen von Malariaparasiten schließen. Dünne Ausstriche wurden dabei im Vergleich zu den Dicken Tropfen in der semiquantitativen Analyse seltener als positiv für Malariaparasiten eingestuft, was auf Grund der geringeren Parasitendichte im dünnen Ausstrich nachvollziehbar erscheint. Es gab wenige Fälle, in denen ein dünner Ausstrich als positiv für Malariaparasiten angesehen und der korrespondierende Dicke Tropfen als malariaparasitennegativ eingestuft wurde.

Weiterhin soll die Anzahl an „pluses“ mit der von uns ausgezählten totalen Anzahl an Parasiten (Parasitämie in 500 RBC) verglichen werden. Dazu wurde die absolute Anzahl von „pluses“ mit der Parasitämie in 500 RBC korreliert. Dabei zeigen Spearman- und Kendall-Tau-b-Test signifikante Korrelationen ($p < 0,01$).

Mit dem Kruskal-Wallis-Test wurde untersucht, ob es einen signifikanten Unterschied in der tatsächlichen Parasitämiehöhe (Parasitämie in 500 RBC) innerhalb der Gruppen, eingeteilt nach der Anzahl an „pluses“, gibt. Mit einem Ergebnis von $p < 0,01$ kann man sagen, dass es keinen signifikanten Unterschied gibt (Abbildung 12). Mit Anzahl an „pluses“, die in der semiquantitativen Analyse vergeben wurden, kann die Parasitämie in 500 RBC gut abgeschätzt werden.

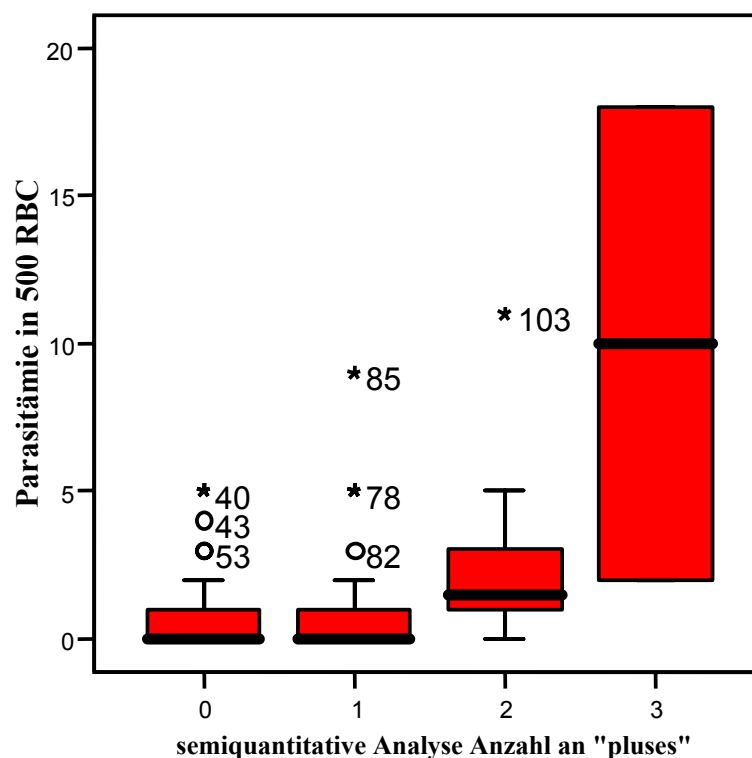


Abbildung 12: Semiquantitative Anzahl an „pluses“ im Verhältnis zur Parasitämie in 500 RBC

5.2.3. Einfluss der totalen Anzahl der altersbestimmten Parasiten pro Ausstrich auf die Anzahl älterer Stadien

Kommen in Ausstrichen, in denen viele Parasiten altersbestimmt wurden, mehr ältere Stadien vor als in Ausstrichen, in denen wenige Parasiten klassifiziert wurden?

Dazu wurden alle Ausstriche, die jemals klassifiziert wurden, in Gruppen eingeteilt, d. h.

Gruppe 1: mehr als 20 Parasiten klassifiziert

Gruppe 2: weniger als 20 Parasiten klassifiziert

Ergebnis: In der Gruppe Splenektomien gibt es signifikante Unterschiede für Stadium 4-6 ($p = 0,015$), Stadium 4+5 ($p = 0,0015$), Stadium 4 ($p = 0,001$), Stadium 6 ($p = 0,046$), aber nicht für Stadium 5 ($p = 0,07$).

In der Kontrollgruppe gibt es signifikante Unterschiede für die Stadien 4-6, Stadium 4+5 ($p = 0,002$), Stadium 4 ($p < 0,0001$), Stadium 6 ($p = 0,046$), aber nicht für Stadium 5 ($p = 0,235$).

Das bedeutet, dass in Ausstrichen, in denen mehr als 20 Parasiten klassifiziert wurden, eine höhere relative Anzahl älterer Stadien (außer Stadium 5 allein) zu finden ist. Allgemeiner ausgedrückt: Ausstriche, die viele Parasiten enthalten, haben eine höhere relative Anzahl älterer Stadien (außer Stadium 5 allein). Dies gilt sowohl für Splenektomien als auch für Kontrollen, ist also unabhängig vom Milzstatus (Tabellen 11 und 12).

Tabelle 11: Alle Ausstriche von Splenektomierten, die jemals klassifiziert wurden

	Gruppe 1: > 20 Parasiten	Gruppe 2: < 20 Parasiten	P (Mann-Whitney- U-Test)
Anzahl	41	22	
Prozentualer Anteil der Stadien 4-6 an der Gesamtzahl der klassifizierten Parasiten (%)	20,1 % (0....94 %)	9,2 % (0....50%)	0,015

Tabelle 12: Alle Ausstriche von Kontrollen, die jemals klassifiziert wurden

	Gruppe 1: > 20 Parasiten	Gruppe 2: < 20 Parasiten	P (Mann-Whitney- U-Test)
Anzahl	13	20	
Prozentualer Anteil der Stadien 4-6 an der Gesamtzahl der klassifizierten Parasiten (%)	6,7 % (0....32%)	9,2 % (0....21%)	0,010

5.3. Auftreten und Einfluss der Parasitämie

5.3.1. Unterschiede in der Häufigkeit von Parasitämien zwischen Splenektomierten und Kontrollen

Ist die Inzidenz von positiven Ausstrichen für Plasmodium falciparum während des 14-monatigen Beobachtungszeitraumes in Splenektomierten höher als in Kontrollen?

Ergebnis: Positive Ausstriche für Plasmodium falciparum wurden durchschnittlich 5,6 mal (4,44....6,72 mal) in der Gruppe Splenektomien und 2,6 mal (1,90....3,41 mal) in der Kontrollgruppe während der 14 Monate beobachtet ($p < 0,01$).

Bezieht man die individuelle Häufigkeit der Teilnahme an den monatlichen Untersuchungen während des 14-monatigen Beobachtungszeitraumes mit ein, so ergibt sich eine Auftretenshäufigkeit von Parasitämien innerhalb aller monatlichen Untersuchungen von 50,83 % (50,53....69,13 %) in Splenektomien und 32,34 % (22,57....42,11 %) in der Kontrollgruppe ($p < 0,01$) (Abbildung 13).

Parasitämien traten während des gesamten Observationszeitraumes von 14 Monaten hochsignifikant häufiger in Splenektomierten als in Kontrollen auf.

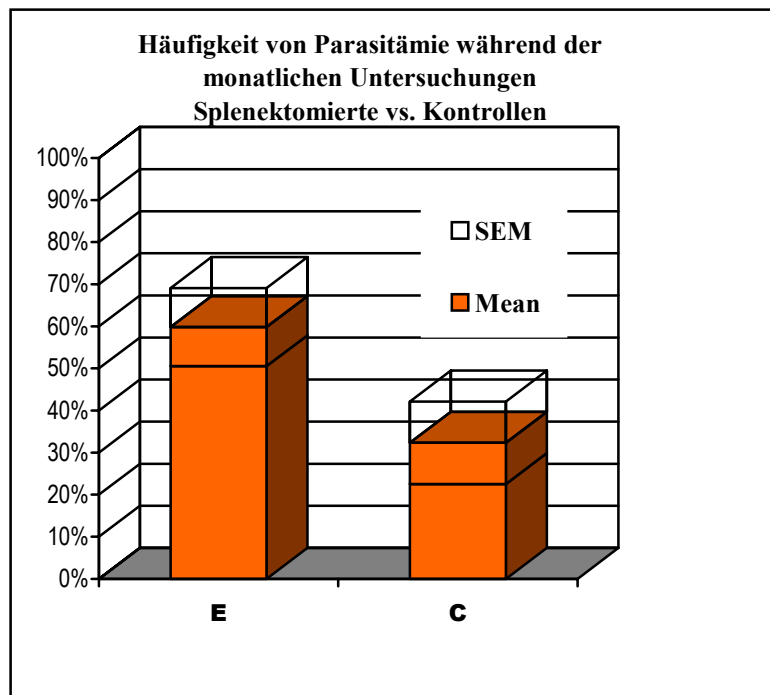


Abbildung 13: Inzidenz positiver Malariaausstriche während des Untersuchungszeitraumes

5.3.2. Unterschiede in der Höhe der Parasitämien zwischen Splenektomierten und Kontrollen

Auswertung nach der semiquantitativen Analyse

Es wurden jeweils ein Dicker Tropfen und ein dünner Ausstrich pro Untersuchung, beide nach der semiquantitativen Analyse beurteilt, getrennt voneinander betrachtet.

Ergebnis: Während des 14-monatigen Untersuchungszeitraumes zeigten Splenektomierte im Vergleich zu Kontrollen innerhalb aller Untersuchungen eine signifikant höhere Parasitämie (größere Häufigkeit der höheren Anzahlen an „pluses“), bewertet nach der semiquantitativen Analyse (p < 0,01). Dies gilt sowohl für die Dicken Tropfen als auch für die dünnen Ausstriche (Abbildung 14).

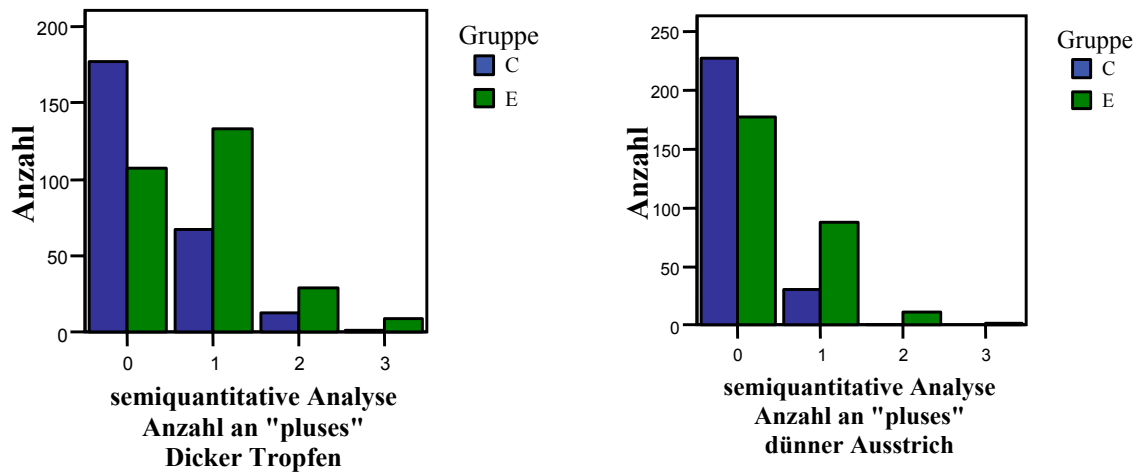


Abbildung 14: Häufigkeitsverteilung der totalen Anzahl an „pluses“ nach der semiquantitativen Analyse zwischen Splenektomierten und Kontrollen im Dicken Tropfen und dünnen Ausstrich

Zum Vergleich wurde nur ein Dicker Tropfen sowie ein dünner Ausstrich zum Zeitpunkt der letzten Kontrolluntersuchung im Februar 2000 von allen an dieser Untersuchung teilnehmenden Splenektomierten und Kontrollen betrachtet. Die Auswertung der Ausstriche erfolgte ebenfalls nach der semiquantitativen Analyse.

Ergebnis: Auch zum Zeitpunkt der letzten Kontrolluntersuchung im Februar 2000 zeigten Splenektomierte im Vergleich zu Kontrollen eine signifikant höhere Parasitämie (größere Häufigkeit der höheren Anzahlen an „pluses“), bewertet nach der semiquantitativen Analyse (p < 0,01).

Dies gilt sowohl für die Dicken Tropfen als auch für die dünnen Ausstriche (Abbildung 15).

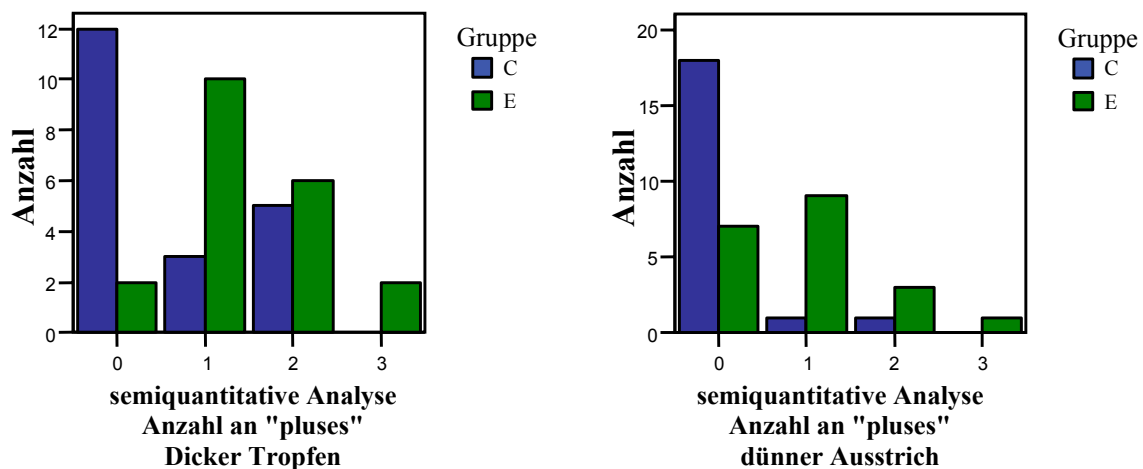


Abbildung 15: Häufigkeitsverteilung der totalen Anzahl an „pluses“ nach der semiquantitativen Analyse zwischen Splenektomierten und Kontrollen im Dicken Tropfen und dünnen Ausstrich, Februar 2000

5.3.3. Einfluss der Höhe der Parasitämie auf die Anzahl älterer Stadien im peripheren Blut unabhängig vom Milzstatus

Es wurden nur alle Dicken Tropfen betrachtet, da diese die größte Anzahl ergaben und im Allgemeinen eine höhere Parasitendichte aufweisen.

Die totale Parasitenanzahl entspricht dabei der Parasitenzahl pro 500 WBC (= Parasitämie). Wurde nur gegen 200 WBC ausgezählt, multiplizierte man diese Anzahl mit 2,5.

Ergebnis: In allen klassifizierten Ausstrichen gibt es keine signifikante Korrelation zwischen totaler Parasitenanzahl und relativem Anteil der Stadien 4-6 ($p = 0,266$), der Stadien 4+5 ($p = 0,221$), der Stadien 5+6 ($p = 0,767$), des Stadiums 5 allein ($p = 0,854$) und des Stadiums 6 allein ($p = 0,673$).

Es gibt eine signifikante Korrelation zwischen totaler Parasitenanzahl und relativem Anteil des Stadiums 4 allein ($p = 0,008$).

Mit Ausnahme des Stadiums 4 hat die Höhe der Parasitämie keinen Einfluss auf die relative Anzahl älterer Stadien im peripheren Blut (Abbildung 16).

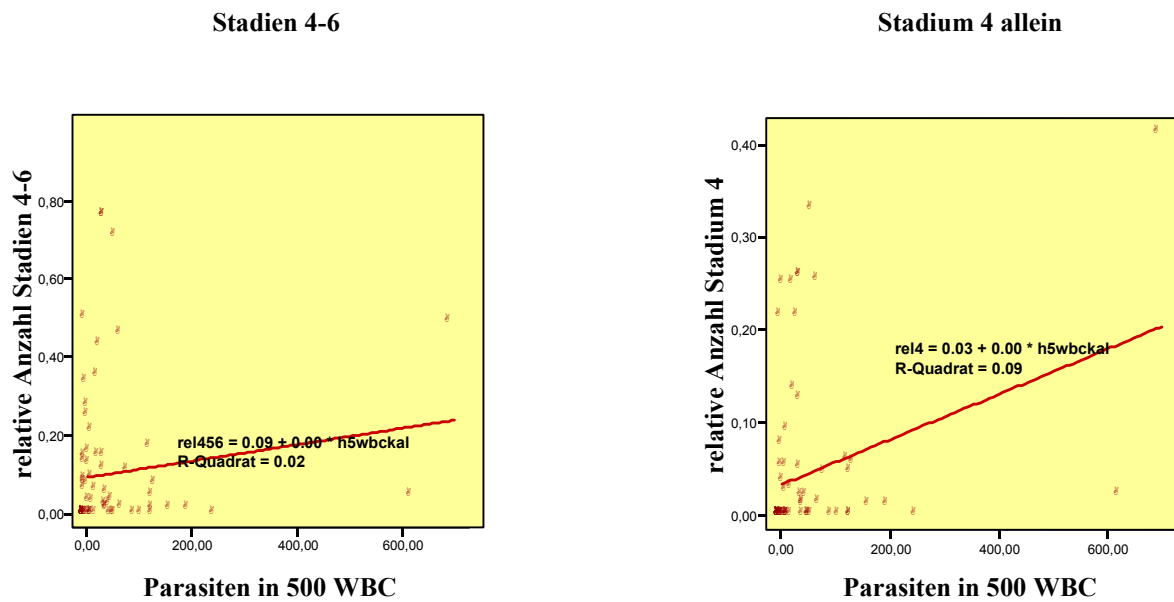


Abbildung 16: Relative Anzahl älterer Stadien im Verhältnis zur totalen Parasitenanzahl (Parasitämie) unabhängig vom Milzstatus

5.3.4. Einfluss der Höhe der Parasitämie auf den Anteil älterer Stadien im peripheren Blut abhängig vom Milzstatus

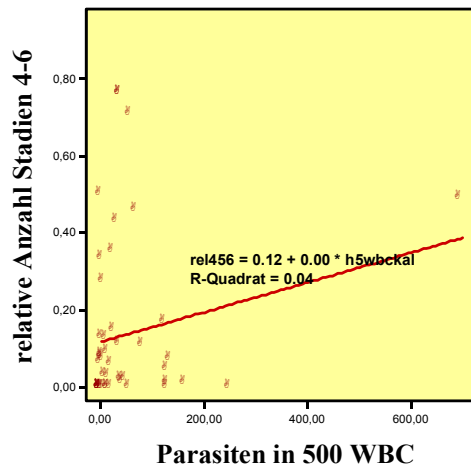
Hier wurden ebenfalls nur die Dicken Tropfen (siehe 5.3.3.) betrachtet.

Ergebnis: In allen Ausstrichen von Milzlosen gibt es keine signifikante Korrelation zwischen totaler Parasitenanzahl und relativem Anteil der Stadien 4-6 ($p = 0,180$), der Stadien 4+5 ($p = 0,161$), der Stadien 5+6 ($p = 0,835$), des Stadiums 5 allein ($p = 0,866$) und des Stadiums 6 allein ($p = 0,862$).

Es gibt eine signifikante Korrelation zwischen totaler Parasitenanzahl und relativer Anzahl des Stadiums 4 ($p = 0,002$).

Auch in Milzlosen zeigt sich, mit Ausnahme des Stadiums 4, keine Korrelation zwischen der Höhe der Parasitämie und dem relativen Anteil älterer Stadien im peripheren Blut (Abbildung 17).

Stadien 4-6



Stadium 4 allein

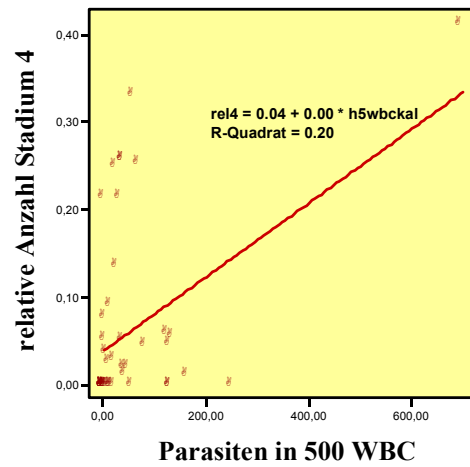


Abbildung 17: Relative Anzahl älterer Stadien im Verhältnis zur totalen Parasitenanzahl (Parasitämie) abhängig vom Milzstatus

5.4. Vorkommen älterer Parasitenstadien im peripheren Blut

5.4.1. Kommen ältere Parasitenstadien während Parasitämie gehäufte im Blut von Splenektomierten vor als in Kontrollen?

a) Qualitative Analyse

Alle klassifizierten Ausstriche wurden eingeteilt, je nachdem, ob ältere Stadien gefunden wurden oder nicht, unabhängig von der absoluten Anzahl dieser Stadien (Tabelle 13). Getestet wurde mit Chi-Quadrat-Test nach Wilcoxon.

Tabelle 13: Vorkommen älterer Stadien in allen jemals klassifizierten Ausstrichen

	E	C	P (Chi-Quadrat-Test)
Gesamtanzahl der Ausstriche	63	33	
Stadium 4-6	40 (65 %)	17 (51,5 %)	0,281
Stadium 4+5	37 (59,7 %)	13 (43,3 %)	0,182
Stadium 4 allein	32 (51,6 %)	10 (33,3 %)	0,121
Stadium 5 allein	26 (41,9 %)	8 (24,2 %)	0,116
Stadium 6 allein	16 (25,4 %)	5 (15,2 %)	0,486

(E: Splenektomierte; C: Kontrollen)

Ergebnis: Es gibt keinen signifikanten Unterschied zwischen Splenektomien und Kontrollen im Auftreten von älteren Stadien, d. h. ältere Parasitenstadien kommen sowohl in Splenektomien als auch in Kontrollen vor. Jedoch gibt es möglicherweise die Tendenz dahingehend, dass in Splenektomien ältere Stadien häufiger vorkommen. Sie erreicht jedoch keine Signifikanz, lässt sich also nicht beweisen.

b) Quantitative Analyse

Alle klassifizierten Ausstriche wurden hinsichtlich der relativen Anzahl von älteren Stadien unabhängig von der totalen Anzahl der Parasiten untersucht. Der Mann-Whitney-U-Test fand Anwendung.

Tabelle 14: Relative Anzahl älterer Stadien in allen jemals klassifizierten Ausstrichen

	E	C	P (Mann-Whitney-U-Test)
Gesamtanzahl der Ausstriche	63	33	
Relative Anzahl der Stadien 4-6	16,3 % (0....94 %)	5,1 % (0....32 %)	0,046
Relative Anzahl der Stadien 4+5	14,3 % (0....94 %)	3,7 % (0....26 %)	0,039
Relative Anzahl Stadium 4 allein	7,4 % (0....41 %)	1,9 % (0....13 %)	0,040
Relative Anzahl Stadium 5 allein	6,9 % (0....62 %)	1,8 % (0....15 %)	0,056
Relative Anzahl Stadium 6 allein	2,0 % (0....56 %)	1,4 % (0....21 %)	0,291

(E: Splenektomien; C: Kontrollen)

Ergebnis: Innerhalb aller jemals klassifizierten Ausstriche oder identischer „Patientenpunkte“ zeigten Splenektomierte einen signifikant höheren relativen Anteil älterer Parasitenstadien (außer Stadium 6) (Tabelle 14).

Das bedeutet, mit Ausnahme des Stadiums 6 haben in dieser Studiengruppe Splenektomierte während Parasitämie signifikant höhere relative Anzahlen älterer Stadien im Blut als Kontrollen (Abbildung 18).

Kontrollen (C) vs. Splenektomierte (E)

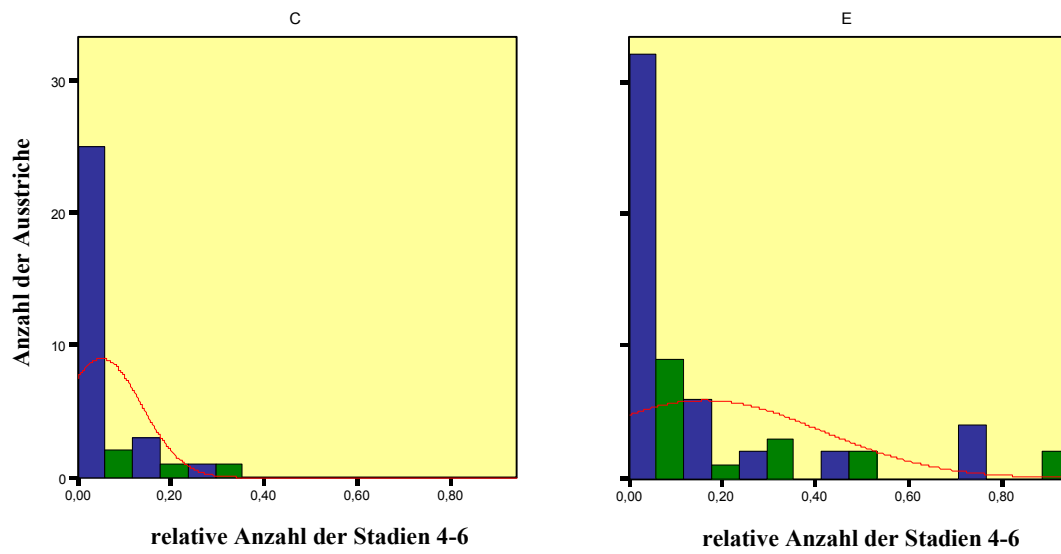


Abbildung 18: Relative Anzahl älterer Parasiten innerhalb aller jemals klassifizierten Ausstriche (identischer Patientenpunkte) Splenektomierte vs. Kontrollen

c) Quantitative Analyse basierend auf Ultraschalluntersuchung

Alle jemals klassifizierten Ausstriche wurden hinsichtlich der relativen Anzahl älterer Parasitenstadien unabhängig von der totalen Anzahl der Parasiten und basierend auf der neuen Gruppeneinteilung nach Ultraschallergebnis untersucht. Der Mann-Whitney-U-Test fand Anwendung.

Tabelle 15: Relative Anzahl älterer Stadien in allen jemals klassifizierten Ausstrichen im auf USS-Ergebnis basierenden Gruppensystem

	S-	S+	P (Mann-Whitney-U-Test)
Gesamtanzahl der Ausstriche	58	44	
Relative Anzahl der Stadien 4-6	16,4 % (0....94 %)	5,7 % (0....33 %)	0,018
Relative Anzahl der Stadien 4+5	14,95 % (0....94 %)	4,3 % (0....26 %)	0,020
Relative Anzahl Stadium 4 allein	7,9 % (0....41 %)	2,7 % (0....25 %)	0,036
Relative Anzahl Stadium 5 allein	7,0 % (0....62 %)	1,6 % (0....15 %)	0,016
Relative Anzahl Stadium 6 allein	1,4 % (0....14 %)	1,4 % (0....21 %)	0,179

(S-: Patienten ohne Nachweis von Milzgewebe im Ultraschall; S+ Patienten mit Nachweis von Milzgewebe im Ultraschall)

Ergebnis: In allen jemals klassifizierten Ausstrichen oder identischen „Patientenpunkten“ zeigten Patienten ohne USS-basiertem Nachweis von Milzgewebe einen signifikant höheren relativen Anteil älterer Parasitenstadien als Patienten mit Nachweis von Milzgewebe, mit Ausnahme des Stadiums 6 (Tabelle 15).

Der Vergleich mit dem Ergebnis in b) zeigt nahezu identische relative Anzahlen älterer Stadien in beiden Gruppen (E/C und S+/S-). Die p-Werte sind in der auf Ultraschalluntersuchung basierenden Gruppe niedriger, was eine klarere Korrelation indiziert.

5.4.2. Transfer der „Patientenpunkte“ in ein Patientenmerkmal

Wie in 5.2.1. beschrieben, ergibt sich das Problem der Messwiederholung am gleichen Objekt. Aus diesem Grund werden nun alle Informationen jedes einzelnen Patienten in einem Parameter zusammengefasst. Dafür wurde eine Schnittlinie für das gehäufte Auftreten von älteren Parasiten definiert. Die Schnittlinie für den Anteil älterer Stadien 4-6 entspricht dabei der 80sten Perzentile aller Ausstriche von Kontrollen. Laut dieser Definition sind die Schnittlinien: 12,0 % für den Anteil der Stadien 4-6

8,5 % für den Anteil der Stadien 4+5

3,2 % für den Anteil des Stadiums 4 allein

2,2 % für den Anteil des Stadiums 5 allein

Das Stadium 6 wurde hier nicht eingeschlossen, da sich in allen Ausstrichen keine signifikanten Unterschiede ergeben haben. Es wurde gezählt, wie oft ein Patient während des 14-monatigen Beobachtungszeitraumes diese Schnittlinie überschritt.

Analyse anhand der auf Ultraschallergebnis basierenden Studiengruppen: Insgesamt überschritten während dieser 14 Monate 12 Patienten ohne nachweisbares Milzgewebe (S-) und 9 Patienten mit nachweisbarem Milzgewebe (S+) diese Schnittlinien mindestens einmal.

Tabelle 16: Häufigkeit der Überschreitung der Schnittlinien für den Anteil älterer Stadien in dem auf USS-basierendem Gruppensystem und Signifikanztestung mit Mann-Whitney-bilateral-exact-U-Test

	S- Mittelwerte (min....max)	S+ Mittelwerte (min....max)	P (Mann-Whitney- bilateral-exact- U-Test)
Anzahl der Patienten	21	33	
Stadium 4-6	1,05 (0....5)	0,33 (0....2)	0,283
Stadium 4+5	1,29 (1....5)	0,45 (0....1)	0,003
Stadium 4 allein	1,24 (0....5)	0,36 (0....1)	0,011
Stadium 5 allein	2,1 (0....5)	1,27 (0....3)	0,156

(USS: Ultraschall; S-: Patienten ohne Nachweis von Milzgewebe im USS; S+: Patienten ohne Nachweis von Milzgewebe im USS; min: Minimum; max: Maximum)

Ergebnis: Wurden die Häufigkeiten der Überschreitung der Schnittlinien als quantitativ messbares Merkmal angesehen und damit der U-Test nach Mann-Whitney verwendet, ergibt sich ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Studiengruppen nur für das Stadium 4 allein ($p = 0,011$) und für die Stadien 4+5 ($p = 0,003$) (Tabelle 16).

Alternativ kann man die Häufigkeiten der Überschreitung der Schnittlinien auch als qualitatives Merkmal auf einer modifizierten Nominalskala betrachten. Wird der Fisher's-bilateral-exact-Test verwendet, erhält man das gleiche Ergebnis mit signifikantem Unterschied zwischen den Studiengruppen für das Stadium 4 allein ($p = 0,045$) und die Stadien 4+5 ($p = 0,016$).

Insgesamt kann man sagen, dass es Unterschiede im Auftreten älterer Parasitenstadien zwischen den Studiengruppen gibt, dies gilt aber nur für die Stadien 4+5 zusammen und das Stadium 4 allein. Diese kommen in Patienten ohne Nachweis von Milzgewebe signifikant häufiger vor.

5.4.3. Modifikation der Analyse in 5.4.2. auf die Häufigkeit der Parasitämien während des Beobachtungszeitraumes

Das Ergebnis in 5.4.2. könnte durch die größere Häufigkeit von Parasitämien in Patienten ohne Milzgewebe (S-) beeinflusst worden sein (siehe 5.3.1.).

Aus diesem Grund wurde die Testung „Überschreitung der definierten Schnittlinien“ auf der Basis der totalen Anzahl der Parasitämien während des 14-monatigen Observationszeitraumes standardisiert.

Tabelle 17: Häufigkeit der Überschreitung der Schnittlinien für den Anteil älterer Stadien während Parasitämie im auf USS-basierenden Gruppensystem und Signifikanztestung mit Mann-Whitney-bilateral-exact-U-Test und T-Test

	S- Mittelwert (min....max)	S+ Mittelwert (min....max)	P (T-Test)	P (U-Test)
Anzahl der Patienten	20	31		
Stadium 4-6	25,5 % (0....83 %)	10,8 % (0....100 %)	0,035	0,012
Stadium 4+5	30,9 % (0....83 %)	14,4 % (0....50 %)	0,029	0,040
Stadium 4 allein	29,3 % (0....83 %)	12,6 % (0....50 %)	0,030	0,050
Stadium 5 allein	35,6 % (0....67 %)	24,5 % (0....50 %)	0,216	0,202

(USS: Ultraschall; S-: Patienten ohne Nachweis von Milzgewebe im USS; S+: Patienten mit Nachweis von Milzgewebe im USS; min: Minimum; max: Maximum)

Ergebnis: Der T-Test wurde durchgeführt, da Lillifors Modifikation des Kolmogoroff-Smirnov-Testes keinen Grund für den Ausschluss einer Normalverteilung lieferte.

Um jedoch eine Vergleichsmöglichkeit zur Analyse in 5.4.2. zu haben wurde ebenfalls der Mann-Whitney-bilateral-exact-U-Test durchgeführt.

Die Standardisierung auf die Parasitämiehäufigkeit zeigt, dass neben den Stadien 4+5 ($p = 0,040$) und dem Stadium 4 allein ($p = 0,050$) nun auch die Stadien 4-6 zusammen ($p = 0,012$) während Parasitämie signifikant häufiger im Blut von Patienten ohne Milzgewebe vorkommen (Tabelle 17.) Dies bestätigen sowohl T-Test als auch U-Test.

Das bedeutet, während jeder vierten Parasitämie überschreiten Milzlose in der Anzahl der älteren Stadien 4-6 die 80ste Perzentile der Kontrollen, während Patienten mit Milz dies nur in jeder zehnten Parasitämieepisode tun.

Wenn also Parasitämie vorkommt, haben Milzlose öfter höhere Anzahlen von älteren Stadien im peripheren Blut als Milzgesunde.

5.5. Andere Einflussfaktoren auf die Parasitämie bzw. das Vorkommen älterer Parasitenstadien im peripheren Blut

5.5.1. HIV-Status der Patienten

Es wurde insgesamt bei 72 der 76 teilnehmenden Personen innerhalb des Studienzeitraumes mindestens einmal der HIV-Status bestimmt. Nicht untersucht wurden 4 Personen, davon je 2 Splenektomierte und Kontrollen.

Zu Beginn des Untersuchungszeitraumes, d. h. zum Zeitpunkt der 1. bis 3. Nachuntersuchung, wurde mit Ausnahme von 17 Patienten ($E = 8$, $C = 8$, $R = 1$) von allen restlichen 55 Patienten der HIV-Status bestimmt.

Diese 17 zu Anfang nicht untersuchten Patienten wurden aber im Verlauf auf HIV-Infektion untersucht. Dabei blieben 15 ($E = 7$, $C = 8$, $R = 0$) bis zum Ende des Untersuchungszeitraumes HIV-negativ, so dass davon auszugehen ist, dass sie das auch zu Anfang des Untersuchungszeitraumes waren. Sie werden deshalb als HIV-negativ in die folgenden Rechnungen mit einbezogen. Die übrigen 2 Personen ($E = 1$, $R = 1$) wurden im Untersuchungsverlauf positiv getestet. Es ist also nicht bekannt, ob sie das auch schon zu Beginn des Untersuchungszeitraumes waren. Sie werden deshalb aus den folgenden Betrachtungen ausgeschlossen.

Insgesamt kann der HIV-Status der Patienten zu Beginn des Untersuchungszeitraumes, d. h. zwischen 1. und 3. Nachuntersuchung, mit insgesamt 13 HIV-Positiven, davon 6 Splenektomierte (46,15 %), 6 Kontrollen (46,15 %) und 1 milzerhaltend Operierten (7,69 %), angegeben werden.

Die übrigen 57 Personen, davon 24 Splenektomierte (42,10 %), 25 Kontrollen (43,86 %) und 8 milzerhaltend Operierte (14,04 %) waren zu diesem Zeitpunkt HIV-negativ (Tabelle 18). Das bedeutet, dass zu Beginn des Untersuchungszeitraumes 18,57 % von 70 Personen HIV-positiv waren. Bezieht man diesen Prozentsatz auf alle 76 an der Studie teilnehmenden Personen so ergibt sich ein Anteil der HIV-Positiven zu Beginn der Studie von 20,16 %.

Tabelle 18: HIV-Status der Patienten zu Beginn des Untersuchungszeitraumes zwischen 1. und 3. Nachuntersuchung

	E	%	C	%	R	%	Summe
HIV positiv	6	46,15 %	6	46,15 %	1	7,69 %	13
HIV negativ	24	42,10 %	25	43,86 %	8	14,04 %	57
Summe	30		31		9		70

(E: Splenektomierte; C: Kontrollen; R: milzerhaltend Operierte/repairs; HIV: Status der Personen für die Infektion mit dem Human immunodeficiency virus)

Zwischen der 3. Nachuntersuchung und dem Studienende serokonvertierten 4 Patienten (E = 1, C = 3, R = 0) in den HIV-positiven Zustand, so dass am Ende des Untersuchungszeitraumes insgesamt 19 Personen nachweislich HIV-positiv waren.

Das entspricht 8 Splenektomierten (42,11 %), 9 Kontrollen (47,36 %) und 2 milzerhaltend Operierten (10,52 %). Es wurden hier die zwei HIV-positiven Personen, von denen der Status nur am Ende bekannt war (siehe oben) wieder mit eingeschlossen.

Jedoch wurde bei 8 der 72 untersuchten Personen (E = 4, C = 4, R = 0) zum Ende des Untersuchungszeitraumes keine erneute HIV-Statusbestimmung durchgeführt, so dass man nicht mit Sicherheit davon ausgehen kann, dass diese Personen auch tatsächlich HIV-negativ geblieben sind. Sie werden deshalb aus der folgenden Berechnung ausgeschlossen.

Man kann sagen, dass 19 von 64 Personen am Ende des Untersuchungszeitraumes HIV-positiv waren, das sind 29,68 % (Tabelle 19). Bezieht man diesen Prozentsatz auf alle an der Studie teilnehmenden 76 Personen, so ergibt sich ein Anteil der HIV-Positiven zum Ende der Studie von 35,24 %.

Tabelle 19: HIV-Status am Ende des Untersuchungszeitraumes

	E	%	C	%	R	%	Summe
HIV positiv	8	42,11 %	9	47,36 %	2	10,52 %	19
HIV negativ	19	42,23 %	18	40,00 %	8	17,78 %	45
Summe	27		27		10		64

(HIV: Human immunodeficiency virus; E: Splenektomien; C: Kontrollen; R: milzerhaltend Operierte/repairs)

5.5.2. Auftreten und Einfluss der Parasitämie

In die folgenden Berechnungen sind nur die jeweils 6 HIV-positiven Splenektomien und Kontrollen eingeschlossen, die bei Studieneinschluss bzw. zu Studienbeginn positiv getestet wurden und damit über den gesamten Studienzeitraum HIV-positiv waren.

Alle anderen HIV-Positiven sind ausgeschlossen, da der genaue Zeitpunkt der Serokonversion nicht bekannt ist oder sie nur zum Ende der Studie getestet wurden.

Inzidenz von positiven Ausstrichen für *Plasmodium falciparum*

Positive Ausstriche für *P. falciparum* fanden sich im Untersuchungszeitraum in der HIV-positiven Gruppe unabhängig vom Milzstatus durchschnittlich 2,25 mal. Bezogen auf die individuelle Teilnahmehäufigkeit an den monatlichen Untersuchungen während des 14-monatigen Beobachtungszeitraumes ergibt sich eine Auftretenshäufigkeit von Parasitämien innerhalb aller monatlichen Untersuchungen von 28,01 %.

Abhängig vom Milzstatus betrachtet, fanden sich positive Ausstriche für *P. falciparum* durchschnittlich 3,0 mal in der Gruppe der HIV-positiven Splenektomierten sowie 1,5 mal in der Gruppe der HIV-positiven Kontrollen.

Bezogen auf die individuelle Teilnahmehäufigkeit an den monatlichen Untersuchungen während des 14-monatigen Beobachtungszeitraumes ergibt sich eine Auftretenshäufigkeit von Parasitämien innerhalb aller monatlichen Untersuchungen von 40,21 % bei HIV-positiven Splenektomien und 15,82 % bei HIV-positiven Kontrollen ($p < 0,01$).

Parasitämiehöhe beurteilt mit der semiquantitativen Analyse

In den folgenden Tabellen 20/21 bzw. Abbildungen 19/20 soll die absolute und relative Häufigkeitsverteilung der Anzahl an „pluses“ beurteilt mit der semiquantitativen Analyse in den Dicken Tropfen und dünnen Ausstrichen für die HIV-Positiven dargestellt werden.

Anschließend wird eine vergleichende Statistik für die Parasitämiehöhe, bewertet in der Anzahl an „pluses“, zwischen HIV-Positiven und HIV-Negativen unabhängig und abhängig vom Milzstatus vorgenommen.

Tabelle 20: Häufigkeiten der Anzahl an „pluses“ im Dicken Tropfen, HIV-Positive

Semiquantitative Analyse in « pluses »	Anzahl der bewerteten Dicken Tropfen Absolute Häufigkeit	Relative Häufigkeit (%)
MP -	41	60,3 %
MP +	18	26,5 %
MP ++	6	8,8 %
MP +++	3	4,4 %
Summe	68	100,0 %

(MP: Malaria-Parasiten in „pluses“)

Häufigkeitsverteilung der Anzahl an "pluses"
Dicker Tropfen, HIV-Positive

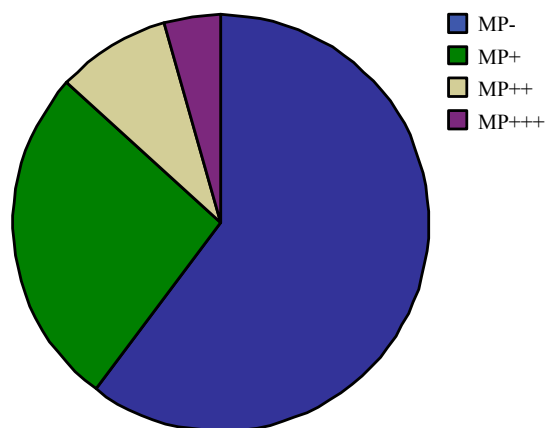


Abbildung 19: Häufigkeitsverteilung der Anzahl an „pluses“ in allen Dicken Tropfen von HIV-Positiven während des gesamten Untersuchungszeitraumes

Tabelle 21: Häufigkeiten der Anzahl an „pluses“ im dünnen Ausstrich, HIV-Positive

Semiquantitative Analyse in « pluses »	Anzahl der bewerteten dünnen Ausstriche Absolute Häufigkeit	Relative Häufigkeit (%)
MP -	50	73,5 %
MP +	14	20,6 %
MP ++	4	5,9 %
MP +++	0	0,0 %
Summe	68	100,0 %

(MP: Malaria Parasiten in „pluses“)

**Häufigkeitsverteilung der Anzahl an "pluses"
dünnen Ausstrich, HIV-Positive**

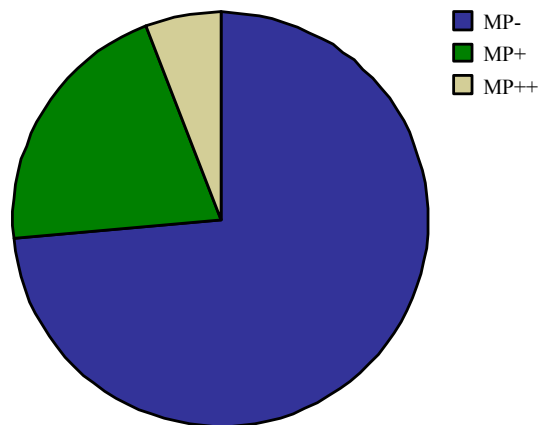


Abbildung 20: Häufigkeitsverteilung der Anzahl an „pluses“ in allen dünnen Ausstrichen von HIV-Positiven während des gesamten Untersuchungszeitraumes

Ergebnis: In einer vergleichenden Analyse ergibt sich kein Unterschied in der Parasitämiehöhe, bewertet in der Anzahl an „pluses“ zwischen HIV-Positiven und HIV-Negativen unabhängig vom Milzstatus. Dies gilt sowohl für die Analyse im Dicken Tropfen ($p = 0,146$) als auch im dünnen Ausstrich ($p = 0,312$).

Abhängig vom Milzstatus, d. h. in Milzlosen gibt es in HIV-Positiven ebenfalls keinen signifikanten Unterschied in der Parasitämiehöhe bewertet in der Anzahl an „pluses“. Dies gilt sowohl für die Analyse im Dicken Tropfen ($p = 0,146$) als auch im dünnen Ausstrich ($p = 0,608$).

5.5.3. Vorkommen älterer Parasitenstadien

Häufigkeiten des Vorkommens älterer Parasitenstadien in allen bewerteten Ausstrichen von HIV-Positiven

In der folgenden Tabelle soll die absolute und relative Häufigkeit des Vorkommens älterer Parasitenstadien in allen bewerteten Ausstrichen von HIV-Positiven unabhängig vom Milzstatus dargestellt werden.

Tabelle 22: Häufigkeit des Vorkommens älterer Parasitenstadien in allen bewerteten Ausstrichen von HIV-Positiven

	Anzahl der positiven Ausstriche für ältere Parasitenstadien (%)	Anzahl der negativen Ausstriche für ältere Parasitenstadien (%)
Stadien 4-6	9 (69,2 %)	4 (30,8 %)
Stadien 4+5	8 (61,5 %)	5 (38,5 %)
Stadium 4 allein	8 (61,5 %)	5 (38,5 %)
Stadium 5 allein	6 (46,2 %)	7 (53,8 %)
Stadium 6 allein	5 (38,5 %)	8 (61,5 %)

Ergebnis: In mehr als zwei Dritteln der Ausstriche von HIV-Positiven findet man während des Untersuchungszeitraumes ältere Parasitenstadien (Stadien 4-6, 4+5, Stadium 4 allein). Das Stadium 5 lässt sich in fast der Hälfte und das Stadium 6 in mehr als einem Drittel aller Ausstriche nachweisen (Tabelle 22).

Unterschiede in Vorkommen und Anzahl älterer Parasitenstadien in allen bewerteten Ausstrichen zwischen HIV-Positiven und HIV-Negativen unabhängig und abhängig vom Milzstatus

Betrachtet wurden alle altersbestimmten Ausstriche von HIV-Positiven und HIV-Negativen, die während des Untersuchungszeitraumes gewonnen wurden.

Ergebnis: Weder unabhängig noch abhängig vom Milzstatus finden sich statistische Unterschiede im Vorkommen sowie in den absoluten und relativen Anzahlen von älteren Parasitenstadien in allen klassifizierten Ausstrichen von HIV-Positiven und HIV-Negativen (Tabellen 23/24). Jedoch zeigt sich eine Tendenz zu niedrigeren p-Werten in milzlosen HIV-Positiven bzw. HIV-Negativen (besonderes beim Stadium 5 allein).

Tabelle 23: Relative Anzahl älterer Parasitenstadien in allen bewerteten Ausstrichen von HIV-Positiven und HIV-Negativen unabhängig vom Milzstatus

	HIV-Positive (min....max)	HIV-Negative (min....max)	P (Mann-Whitney- U-Test)
Gesamtanzahl der Ausstriche	8	111	
Relative Anzahl der Stadien 4-6	26,6 % (0....83 %)	12,4 % (0....100 %)	1,610
Relative Anzahl der Stadien 4+5	18,3 % (0....67 %)	11,1 % (0....100 %)	0,835
Relative Anzahl Stadium 4 allein	6,7 % (0....33 %)	7,1 % (0....63 %)	0,670
Relative Anzahl Stadium 5 allein	11,6 % (0....46 %)	4,0 % (0....50 %)	1,588
Relative Anzahl Stadium 6 allein	8,3 % (0....27 %)	1,3 % (0....53 %)	2,602

(HIV: Human immunodeficiency virus; min: Minimum; max: Maximum)

Tabelle 24: Relative Anzahl älterer Parasitenstadien in allen bewerteten Ausstrichen von milzlosen HIV-Positiven und HIV-Negativen

	HIV-Positive (min....max)	HIV-Negative (min....max)	P (Mann-Whitney- U-Test)
Gesamtanzahl der Ausstriche	4	64	
Relative Anzahl der Stadien 4-6	40,6 % (0....83 %)	17,0 % (0....100 %)	0,184
Relative Anzahl der Stadien 4+5	33,2 % (0....67 %)	11,1 % (0....100 %)	0,175
Relative Anzahl Stadium 4 allein	12,1 % (0....33 %)	7,1 % (0....63 %)	0,336
Relative Anzahl Stadium 5 allein	21,1 % (0....46 %)	4,0 % (0....50 %)	0,056
Relative Anzahl Stadium 6 allein	7,4 % (0....27 %)	1,3 % (0....53 %)	0,510

(HIV: Human immunodeficiency virus; min: Minimum; max: Maximum)

Häufigkeiten des Vorkommens älterer Parasitenstadien in jedem HIV-positiven Patient

Zunächst wurden dazu die Mittelwerte der absoluten Anzahlen der älteren Parasitenstadien bezogen auf die Anzahl der bewerteten Ausstriche während des Untersuchungszeitraumes gebildet, so dass pro HIV-Positivem nur eine absolute Anzahl für die älteren Stadien in die Bewertung eingeht.

Danach wurde geprüft, ob ältere Stadien während des Untersuchungszeitraumes in HIV-Positiven vorkommen oder nicht (Tabelle 25).

Tabelle 25: Häufigkeit des Vorkommens älterer Parasitenstadien in HIV-Positiven

	Anzahl der HIV-Positiven mit älteren Stadien (%)	Anzahl der HIV-Positiven ohne ältere Stadien (%)
Stadien 4-6	5 (83,3 %)	1 (16,7 %)
Stadien 4+5	5 (83,3 %)	1 (16,7 %)
Stadium 4 allein	5 (83,3 %)	1 (16,7 %)
Stadium 5 allein	4 (66,7 %)	2 (33,3 %)
Stadium 6 allein	3 (50,0 %)	3 (50,0 %)

(HIV: Human immunodeficiency virus)

Ergebnis: In mehr als 80 % der HIV-Positiven findet man während des Untersuchungszeitraumes ältere Parasitenstadien (Stadien 4-6; Stadium 4 allein). Das Stadium 5 lässt sich in mehr als zwei Dritteln und das Stadium 6 in der Hälfte der HIV-Positiven nachweisen. Dies ist unabhängig vom Milzstatus.

Unterschiede in Vorkommen und Anzahl älterer Parasitenstadien zwischen HIV-Positiven und HIV-Negativen unabhängig und abhängig vom Milzstatus

Hier wurde wieder jeder Patient, von dem mindestens 1 auswertbarer altersbestimmter Ausstrich vorlag, einzeln betrachtet. Dazu bildete man Mittelwerte der absoluten Anzahl der altersbestimmten Parasiten bezogen auf die Anzahl der altersbestimmten Ausstriche im Untersuchungszeitraum (siehe oben).

Verglichen wurden die Häufigkeit des Vorkommens von älteren Parasitenstadien sowie die absoluten und relativen Anzahlen der älteren Parasitenstadien zwischen HIV-Positiven und HIV-Negativen unabhängig und abhängig vom Milzstatus.

Ergebnis: Weder unabhängig noch abhängig vom Milzstatus finden sich statistische Unterschiede im Vorkommen sowie in den absoluten und relativen Anzahlen von älteren Parasitenstadien zwischen HIV-Positiven und HIV-Negativen (Tabellen 26/27).

Tabelle 26: Relative Anzahl älterer Parasitenstadien in HIV-Positiven und HIV-Negativen unabhängig vom Milzstatus

	HIV-Positive (min....max)	HIV-Negative (min....max)	P (Mann-Whitney- U-Test)
Anzahl der Patienten	6	40	
Relative Anzahl der Stadien 4-6	31,7 % (0....83 %)	13,9 % (0....88 %)	0,217
Relative Anzahl der Stadien 4+5	23,9 % (0....67 %)	11,3 % (0....55%)	0,348
Relative Anzahl Stadium 4 allein	8,7 % (0....33 %)	7,1 % (0....44)	0,563
Relative Anzahl Stadium 5 allein	15,2 % (0....46 %)	4,2 % (0....27 %)	0,140
Relative Anzahl Stadium 6 allein	7,7 % (0....27 %)	2,5 (0....53 %)	0,340

(HIV: Human immunodeficiency virus; min: Minimum; max: Maximum)

Tabelle 27: Relative Anzahl älterer Parasitenstadien in milzlosen HIV-Positiven und HIV-Negativen

	HIV-Positive (min....max)	HIV-Negative (min....max)	P (Mann-Whitney- U-Test)
Anzahl der Patienten	4	22	
Relative Anzahl der Stadien 4-6	40,6 % (0....83 %)	21,7 % (0....88 %)	0,392
Relative Anzahl der Stadien 4+5	33,2 % (0....67 %)	17,4 % (0....55 %)	0,392
Relative Anzahl Stadium 4 allein	12,1 % (0....33 %)	10,1 % (0....44 %)	0,720
Relative Anzahl Stadium 5 allein	21,1 % (0....46 %)	7,2 % (0....28 %)	0,223
Relative Anzahl Stadium 6 allein	7,4 % (0....27 %)	4,4 % (0....53 %)	0,883

(HIV: Human immunodeficiency virus; min: Minimum; max: Maximum)

5.6. Klinische Ausprägung der Malaria und Unterschiede zwischen Splenektomierten und Kontrollen

Die Malaria tropica wurde in 5 klinische Konstellationen (siehe 4.4.) eingeteilt. Es sollte nun geprüft werden, wie oft diese in Splenektomierten im Vergleich zu Kontrollen vorkommen.

Ergebnis: In der Auftretenshäufigkeit von asymptomatischer Parasitämie (P) gibt es keinen Unterschied zwischen den Studiengruppen (E: 21,6 % / C: 24,3 %; $p > 0,05$).

Residuale Parasitämie (RP) mit wahrscheinlichen Malariasymptomen innerhalb des letzten Monats trat ca. viermal häufiger in Splenektomierten als in Kontrollen auf (E: 11,9 % / C: 3,0 % ; $p < 0,01$).

Wahrscheinliche Malaria (MM) und mindestens ein positiver Ausstrich zum Untersuchungszeitpunkt trat fast sechsmal häufiger in Splenektomierten als in Kontrollen auf (E: 18,3 % / C: 3,3 %; $p < 0,001$).

Bewiesene Malaria (PM) trat ca. viermal häufiger in Splenektomierten als in Kontrollen auf (E: 8,5 % / C: 1,99 %; $p < 0,05$).

Schwere Malaria (SM) wurde in keiner Gruppe beobachtet.

Mit Ausnahme der schweren Malaria (SM) wurden symptomatische Konstellationen häufiger in Splenektomierten gefunden.

6. Diskussion

6.1. Methodendiskussion

6.1.1. Patientenrekrutierung

In diese Studie konnten insgesamt 76 Personen eingeschlossen werden, davon 33 Splenektomierte (28,45 %), 33 Kontrollen und 10 milzerhaltend Operierte (8,62 %).

Die Patientenzahlen ergaben sich aus 116 (100 %) an den 3 Zentralkrankenhäusern (QUECH, LCH, ZCH) Malawis zwischen Januar 1995 und Oktober 1999 mit der Diagnose traumatische Milzruptur operativ behandelten Patienten. Das bedeutet, dass insgesamt nur 37 %, der auf Grund traumatischer Milzruptur behandelten Patienten in die Studie eingeschlossen werden konnten.

Der Grund dafür ist einerseits, dass die traumatische Milzruptur eine relativ seltene Diagnose und auch nicht in allen Fällen operativ zu behandeln ist. Deshalb musste auf Patientenakten aller 3 Zentralkrankenhäuser Malawis zurückgegriffen werden. Ein weiteres Problem stellten die Patientenakten an sich dar. Sie standen nicht bei allen Patienten zur Verfügung.

Das entspricht der typischen alltäglichen Situation in einem Krankenhaus eines Entwicklungslandes, wo weniger Wert auf genaue und exakte Dokumentation bzw. Archivierung gelegt wird. Eine weitere Schwierigkeit war die Auffindbarkeit der Patienten. Dieses gelang bei diesen 46 Personen mit enormem zeitlichen und finanziellen Aufwand. Man kann insgesamt sagen, dass die Patienten durch die oben genannten Fakten nicht speziell selektiert und diese Stichprobe für die malawischen Verhältnisse als repräsentativ anzusehen ist.

Hinsichtlich der statistischen Auswertung und Übertragbarkeit der Ergebnisse auf milzlose Personen in Malariaendemiegebieten, wäre es sicherlich von Vorteil, eine größere Stichprobe nur einmalig zu untersuchen. Dieses war aber durch die oben erörterten Gründe unmöglich. Deshalb wurde diese kleinere Stichprobe über einen längeren Zeitraum monatlich, also mehrfach, untersucht. Damit sollten genauere Werte innerhalb dieser Stichprobe erreicht werden. Dies ermöglicht es am Ende, die Verhältnisse innerhalb aller Splenektomierten in Malariaendemiegebieten abzuschätzen.

Innerhalb der Untersuchungsgruppen kann man jedoch eine deutliche Überzahl an männlichen Personen feststellen, was dem unterschiedlichen Risikoprofil, beispielsweise in Unfälle etc. verwickelt zu werden, zwischen den beiden Geschlechtern zuzutragen ist.

Durch das „matching“ wurde versucht, zwischen den Untersuchungsgruppen eine relative Gleichheit hinsichtlich des Geschlechts und anderen körperlichen und sozialen Parametern herzustellen, so dass man davon ausgehen kann, dass diese Parameter keinen wesentlichen Einfluss auf die Studienergebnisse haben.

6.1.2. Auswahl der für die Altersbestimmung genutzten Ausstriche

Insgesamt wurden während des Untersuchungszeitraumes 2616 Ausstriche gewonnen. Diese wurden zunächst mittels der semiquantitativen Analyse, einem in Malawi routinemäßig durchgeführten Verfahren zum Nachweis von Malariaparasiten im Dicken Tropfen, bewertet. Dieses Verfahren kam hierbei sowohl für die Auswertung der Dicken Tropfen als auch für die dünnen Ausstriche, obwohl hier unüblich, zur Anwendung. Erfahrene Labortechniker des Zomba Zentralkrankenhauses, die alltäglich in die Malariadiagnostik involviert sind, führten diese Auswertung durch.

Es zeigte sich, dass im Dicken Tropfen Unterschiede zwischen der semiquantitativen Analyse und der von uns durchgeführten Analyse hinsichtlich des Nachweises von Malariaparasiten und der Höhe der Parasitämie bestehen. Man kann im Dicken Tropfen bei Nachweis von Malariaparasiten in der semiquantitativen Analyse nicht auf das tatsächliche Vorkommen von Parasiten schließen. Ebenso wenig lässt die vergebene Anzahl an „pluses“ einen Schluss auf die tatsächliche Parasitämie in 500 WBC zu. Dabei wurden mit der semiquantitativen Analyse mehr Ausstriche als positiv für Malariaparasiten bewertet als mit der von uns durchgeführten tatsächlichen quantitativen Auswertung. Dieses könnte für die größere Erfahrung der Labortechniker sprechen. Für die Auswahl der Ausstriche ist dies als positiv zu bewerten, da somit keine oder kaum positive Dicke Tropfen für unsere Auswertung verloren gingen.

Ursächlich für die statistischen Unterschiede könnte auch eine Selektion von positiven Dicken Tropfen nach der semiquantitativen Analyse sein, d. h. von uns wurden nur in der semiquantitativen Analyse als positiv bewertete Dicke Tropfen angeschaut. Negative wurden verworfen, so dass letztendlich eine spezielle Auswahl von geeigneten Dicken Tropfen/dünnen Ausstrichen für die Altersbestimmung getroffen wurde.

Im dünnen Ausstrich hingegen finden sich diese statistischen Unterschiede nicht, d. h., hier lässt sich mit dem Vorkommen von „pluses“ auch auf das tatsächliche Vorkommen von Malariaparasiten schließen bzw. die Anzahl an „pluses“ korreliert gut mit der Höhe der Parasitämie in 500 RBC.

Das könnte gegen die These der größeren Erfahrung der Labortechniker sprechen, da im dünnen Ausstrich generell weniger Parasiten zu finden und somit auch schwieriger nachzuweisen sind. Es spricht eher für die im Dicken Tropfen angenommene Selektion von positiven Ausstrichen, da von uns mehr negative dünne Ausstriche angesehen wurden. Das war z. B. der Fall wenn ein korrespondierender Dicker Tropfen positiv für Malariaparasiten, von eher schlechter Qualität oder im Verlauf der Untersuchungen unauffindbar war.

Zusammenfassend lässt sich zur semiquantitativen Analyse sagen, dass sie für die Auswahl der zur Alters- und Parasitämiebestimmung genutzten Ausstriche notwendig war, um alle gewonnenen Ausstriche in einem angemessenen Zeitaufwand bearbeiten zu können. Diese Bewertungsmethode scheint sowohl im Dicken Tropfen als auch im dünnen Ausstrich gerechtfertigt zu sein, da sie keine oder kaum positive Ausstriche „übersieht“. Jedoch ist sie hinsichtlich einer genauen Aussage zur Parasitämie zumindest im Dicken Tropfen ungenau. Daher wäre es für zukünftige Auswertungen besser, entweder alle Ausstriche nach beiden Methoden zu evaluieren oder generell nur die tatsächliche Bestimmung durchzuführen.

Nach der semiquantitativen Auswertung standen dennoch eine große Anzahl von positiven Ausstrichen für *Plasmodium falciparum* (n = 703) zur Analyse zur Verfügung. Davon wurden nur 96 Ausstriche für die Berechnungen zur Altersbestimmung von *Plasmodium falciparum* im peripheren Blut selektiert. Das waren vorwiegend hochparasitämische Ausstriche (vgl. semiquantitative Analyse MP ++/+++). In diesen war es einfacher und schneller möglich, eine große Anzahl von Parasiten zu klassifizieren. Es wurden darüber hinaus auch niedriger parasitämische Ausstriche (vgl. semiquantitative Analyse MP +) eingeschlossen, um eine relative Gleichzeit zwischen den Untersuchungsgruppen zu erreichen.

Die Ursache dafür ist die unterschiedliche Parasitämiehäufigkeit und -höhe in den einzelnen Untersuchungsgruppen, d. h., Splenektomierte bzw. Milzlose hatten während des Untersuchungszeitraumes häufiger und höhere Parasitämien.

Zwar finden sich in Ausstrichen, in denen mehr Parasiten klassifiziert wurden, auch mehr ältere Parasitenstadien. Eine Beeinflussung des Vorkommens älterer Parasitenstadien durch diese Umstände konnte aber insofern ausgeschlossen werden, als dass die Parasitämehöhe in Splenektomierten und Milzgesunden keinen Einfluss auf das Auftreten älterer Parasitenstadien hat. Zusätzlich wurden die nachfolgenden Berechnungen auch auf die unterschiedlichen Parasitämehäufigkeiten innerhalb der Gruppen während des Untersuchungszeitraumes bezogen.

Zusammenfassend kann man sagen, dass unsere Auswahl, der für die Alters- und Parasitämiebestimmung genutzten Ausstriche, gerechtfertigt war, da es eine große Anzahl von dünnen Ausstrichen bzw. Dicken Tropfen in einem gewissen zeitlichen und aufwanderträglichen Rahmen zu untersuchen galt.

6.1.3. Durchführung der Parasitämie- und Altersbestimmung

Die Parasitämiebestimmung wurde nach standardisierten Bedingungen zunächst semiquantitativ, wie es in der malawischen Routinediagnostik üblich ist, durch erfahrene Labortechniker vorgenommen. Dies diente dazu, die relevanten parasitämischen Ausstriche zu identifizieren, die nachfolgend der genauen Parasitämie- sowie Altersbestimmung zugeführt wurden. Diese Methode war notwendig, um, wie bereits erörtert, eine Auswertung der Ausstriche mit einem angemessenen Zeit- und Arbeitsaufwand durchführen zu können. Sie spiegelt darüber hinaus die realen diagnostischen Bedingungen in einem Entwicklungsland wie Malawi wider. Nachfolgend wurde, wie im Methodenteil beschrieben, die genaue Parasitämiebestimmung in den dünnen Ausstrichen und Dicken Tropfen getrennt zur Altersbestimmung durchgeführt. Jedoch wurde die genaue Parasitämiebestimmung in einigen wenigen niedrigparasitämischen Ausstrichen auch kombiniert vorgenommen. Dies ist wiederum einem angemessenen Zeitaufwand geschuldet.

Diese weiterführende Methode rechtfertigt sich dahingehend, als dass die Parasitämehöhe, wie gezeigt wurde, weder in Splenektomierten noch in Milzgesunden Einfluss auf das Vorkommen älterer Parasitenstadien hat.

Die Stadieneinteilung an sich basiert auf morphologischen Gesichtspunkten, die modifiziert in medizinischen Schriften publiziert wurden. Sie deckt sich mit funktionellen Eigenschaften der Parasiten, was z. B. die Expressierung von zytoadhärenzfördernden Oberflächenantigenen, Anfälligkeit für die Milzabwehr etc. angeht (siehe auch 6.4.) (Lehmanns medizinische Atlanten 1914/ Tafel 13, Silamut und White 1993, Cook 1998). Ob weitere Unterformen der beschriebenen Stadien hinsichtlich der Oberflächenantigene bzw. anderer unbekannter Merkmale existieren, ist nicht bekannt oder beschrieben und wurde hier auch nicht untersucht. Man kann sagen, dass die von uns postulierten Stadien der gängigen Einteilung der Parasitenstadien entsprechen, diese vor allem auch mikroskopisch nachweisbar und unterscheidbar sind. Kritisch zu bemerken muss man jedoch, dass es sicherlich erfahrungs- und untersucherabhängig ist, in welches Stadium einzelne Parasiten einzuordnen sind. Dies ist vor allem bei den „Grenzstadien“ zwischen späten Ringformen und reifen Parasiten/frühen Trophozoiten, wie etwa den Stadien 3 und 4, der Fall. In diesen Stadien spielt der Nachweis des Malariapigmentes eine entscheidende Rolle. Normalerweise gut sichtbar, kann aber auch nur schwach ausgebildet sein und dadurch übersehen werden (Silamut und White 1998). Da am Ende ein statistisch verwertbares Ergebnis hinsichtlich der Häufigkeit des Auftretens älterer Parasitenstadien gewonnen wurde, ist der Fehler durch etwaige Fehlbestimmung einzelner Parasiten als gering einzuschätzen.

6.2. Inzidenz von Parasitämie

Die Milz spielt eine wichtige Rolle in der Abwehr von Infektionen (Looareesuwan et al. 1993). Gezeigt werden konnte dies für Malaria anhand einer höheren Empfindlichkeit gegenüber Plasmodien bzw. der Schwere der Erkrankung bei splenektomierten Tieren (Ho et al. 1990, Looareesuwan et al. 1993). Auch bei dem milzlosen Menschen scheint eine Prädisposition zu verschiedenen Infektionen, wie z. B. durch eine reduzierte zelluläre Antwort auf Streptokokkenantigen eine erhöhte Neigung zu Pneumokokkeninfektionen/-sepsis, vorzuliegen (Styrt 1990, Balsalobre und Carbonell-Tatay 1991).

Der Mensch hat nach Splenektomie ein großes Risiko, an Malaria zu erkranken, was sich an einer hohen annehmbaren Inzidenz für Malaria bzw. Parasitämie bzw. verlängerterten Malariaattacken zeigt (Maharaj et al. 1982, Boone und Watters 1995, Grobusch et al. 2003).

Unsere Studie bestätigt diese Beobachtungen. Während des gesamten Untersuchungszeitraumes von 14 Monaten waren bei Splenektomierten die Hälfte aller Blutaussstriche positiv für *Plasmodium falciparum*. Im Gegensatz dazu war dies nur bei einem Drittel der Blutaussstriche von Kontrollen der Fall.

Das bedeutet, dass die Inzidenz für Parasitämie nach Splenektomie hochsignifikant erhöht ist. Eine Beeinflussung durch die unterschiedliche Häufigkeit der Teilnahme an den monatlichen Untersuchungen konnte ausgeschlossen werden.

Erklärbar ist dies durch den Verlust des größten sekundären lymphatischen Organes des Menschen, welches in *Plasmodium-falciparum*-Infektionen die Abwehr durch komplexe Mechanismen beeinflusst.

Dabei richtet sich der Schutzeffekt der Milz vor allem gegen intraerythrozytäre Parasiten (Looareesuwan et al. 1993). Er involviert neben rheologischen Mechanismen bzw. mechanischer Filtration, den zellulären Komponenten der Abwehr, auch die Phagozytose von antikörpersensibilisierten parasitierten Erythrozyten durch Makrophagen/mononukleäre Zellen (Ho et al. 1990, Looareesuwan et al. 1993). Des weitern trägt die Milz durch bislang unbekannte Mechanismen zur Exprimierung von spezifischen Oberflächenantigenen auf der Membran von parasitierten Erythrozyten bei bzw. moduliert diese (Looareesuwan et al. 1993). Es wird generell angenommen, dass diese Oberflächenantigene zur Zytoadhärenz beitragen und damit dem Parasiten ermöglicht wird, der Abwehr durch die Milz zu entgehen, indem sie aus der peripheren Zirkulation verschwinden (Miller et al. 2002).

Fehlt die Milz, erfolgt die Entfernung von infizierten roten Blutzellen aus der Zirkulation weniger oder nur verlangsamt (Engwerda et al. 2005). Es werden vermehrt (chronische) Infektionen in Nagern oder im Affen in *P.-cynomolgi*- aber auch *P.-falciparum*-Infektionen beobachtet (Barnwell et al. 1983, Schmidt et al. 1987, Engwerda et al. 2005).

Überträgt man die bekannten Fakten auf die von uns gemachten Beobachtungen, kann man sagen, dass durch das Fehlen der Milz die Parasiten entweder länger im peripheren Blut persistieren oder es öfter zu dem für *P. falciparum* typischen Wiederauftreten von Parasiten im Blut nach zuvor behandelter Infektion kommt (vgl. Experimente in splenektomierten Affen von Gysin et al. 1982). Eine weitere Hypothese ist, dass Splenektomierte empfänglicher für Neuinfektionen sind und man dadurch häufiger Parasiten im peripheren Blut nachweisen kann. Dieses Phänomen könnte man einerseits durch die fehlende Modulation von zytoadhärenzfördernden Oberflächenantigenen durch die Milz und damit deren fehlende Exprimierung erklären.

Das bedeutet, dass parasitierte Erythrozyten in Milzlosen wahrscheinlich weniger zytoadhärieren und damit häufiger im peripheren Blut nachgewiesen werden.

Außerdem scheint hier der Verlust der Milzabwehr generell eine Rolle zu spielen, wodurch parasitierte RBCs nicht oder nur verlangsamt aus der Zirkulation entfernt werden. Diese zwei Mechanismen: fehlende Milzclearance und verminderte Zytoadhärenz tragen wahrscheinlich zum Anstieg der Parasitämieinzidenz bei.

An zwei milzlosen Patienten konnte dieses gezeigt werden. Sie hatten eine höhere und verlängerte Parasitämie, es ist davon auszugehen, dass weder Milzclearance noch Sequestration vorkam (Demar et al. 2004).

Zusätzlich könnte die Antikörperbildung sowie die zelluläre Abwehr gegen *P. falciparum* durch den Milzverlust und damit wichtiger Zellpopulationen wie B- und T-Zellen reduziert sein.

6.3. Höhe der Parasitämie

Wie im vorangegangenen Abschnitt beschrieben, neigen Milzlose zu häufigeren und langdauernden Malariaattacken, was sich durch den Verlust der Filterfunktion der Milz bzw. an dem fehlenden modulierenden Einfluss auf die zytoadhärenzfördernde Expressierung von Oberflächenantigenen durch die Milz erklären ließe.

In tierischen und menschlichen Malariainfektionen zeigten Splenektomierte höhere periphere (Spitzen)-Parasitämien, verminderte Sequestration und verlängerte Clearanceraten (Israeli et al. 1987, Roth et al. 1988, Pongponratn et al. 2000, Chotivanich et al. 2002, Demar et al. 2004).

Diese Studie bestätigt die in der Literatur beschriebenen Beobachtungen ebenfalls. Betrachtet man zu jedem Untersuchungszeitpunkt jeweils einen Dicken Tropfen und einen dünnen Ausstrich nach der semiquantitativen Analyse, so zeigen Splenektomierte im Vergleich zu Kontrollen im gesamten Untersuchungszeitraum eine hochsignifikant höhere Parasitämie. Auch zu einem bestimmten Untersuchungszeitpunkt, hier im Februar 2000, hatten Splenektomierte im Vergleich zu Kontrollen höhere Parasitämien.

Die Höhe der Parasitämie entspricht dabei der Anzahl an „pluses“, die durch die Labortechniker im Rahmen der semiquantitativen Analyse vergeben wurden.

Sicherlich ist die Aussagekraft dieser Analyse betreffend der Dicken Tropfen eingeschränkt. Sie wurde aber dennoch als Kriterium zum Vergleich der Parasitämehöhe zwischen den beiden Gruppen gewählt, da dadurch von jedem Patienten bzw. jeder Kontrolle pro Untersuchungstermin ein Dicker Tropfen und ein dünner Ausstrich in die Berechnung eingehen konnte. Eine tatsächliche Parasitämiebestimmung wurde im Vergleich dazu nicht von jedem Patienten/jeder Kontrolle bei jedem Untersuchungstermin durchgeführt.

Damit relativiert sich auch die relativ schlechte Voraussage der tatsächlichen Parasitämie im Dicken Tropfen. Da die Aussagekraft der semiquantitativen Analyse für den dünnen Ausstrich gezeigt wurde, kann man dennoch mit Sicherheit sagen, dass Splenektomierte im Vergleich zu Kontrollen im Studienverlauf höhere Parasitämien hatten.

Erklärbar ist dies durch das Fehlen des Milzfilters, der parasitierte Erythrozyten durch verschiedene Mechanismen aus der systemischen Zirkulation entfernt. Dabei spielt die Fc-Rezeptor vermittelte Clearance von IgG bedeckten pRBCs durch Milzmakrophagen eine entscheidende Rolle. Sie ist während akuter Malariainfektionen beschleunigt und wichtig für die Reduktion der Parasitämie (Lee et al. 1989, Ho et al. 1990). Eine hohe Parasitenzahl im peripheren Blut verlängert dabei die Entfernung von pRBCs (Ho et al. 1990). Oder anders ausgedrückt, kann die Fc-Rezeptorfunktion der Milz nicht verbessert werden, führt dies zu hohen Parasitämien wie in unserem Patientenkollektiv, die über keine Milzfunktion verfügen. Des weiteren spielt die Milz wahrscheinlich eine entscheidende Rolle für die Exprimierung von zytoadhärenzfördernden Antigenen. Damit binden die reiferen Parasitenstadien an Endothelzellen verschiedener Organe und verschwinden aus der systemischen Zirkulation (Looareesuwan et al. 1993). Beides zusammen erklärt, dass Splenektomierte über den gesamten Untersuchungszeitraum höhere Parasitenzahlen im Blut aufwiesen.

Es könnte auch ein Hinweis dafür sein, dass bestimmte „Milzersatzmechanismen“ bzw. andere Organe der Abwehr wie Lymphknoten und Leber relativ ineffektiv sind oder diese die Milz zumindest nicht komplett ersetzen können. Im Mausmodell wurden milzähnliche Pseudofollikel mit malariapigmententhaltenden Makrophagen bzw. funktionellen T-Zellen in der Leber nachgewiesen sowie zusätzlich eine milzunabhängige Antikörpersyntheseinduktion postuliert (Weiss 1985). Es ist zwar wahrscheinlich, dass auch in unseren Patienten eine Malariaabwehr ohne Milz in anderen Organen stattfindet, in welchem Rahmen bleibt jedoch ungeklärt.

6.4. Vorkommen von älteren Parasitenstadien

Wenn sich der Malariaparasit intraerythrozytär entwickelt und über verschiedene Entwicklungsstufen von der Ringform zum Schizonten heranwächst, verändert sich die Membranoberfläche der pRBC. Es werden neue Antigene und parasitäre Antigene in die Membran der roten Blutzelle eingebaut. Diese teilweise varianten Antigene wie das PfEMP 1 sind hochvariabel und damit hochimmunogen (Cook 1998, Saul 1999). Sie induzieren zunächst bei Erstinfektion eine unspezifische, bei allen folgenden Infektionen eine spezifische Antikörperreaktion, die sich gegen diese jeweils artspezifischen Antigene richtet.

Des weiteren sind antigene Strukturen wie das PfEMP 1 zusammen mit verschiedenen DBL- und histidinreichen knob-assoziierten Proteinen sowie anderen parasitären Oberflächenproteinen (wie PfEMP 2/3, RESA, MESA u. a.) an der Bildung sogenannter „knobs“ oder elektronendichter Protrusionen beteiligt. Dabei ist ein funktionsfähiges KAHR-Protein für die Ausformung der knopfähnlichen Strukturen besonders wichtig (Waller et al. 1999). Diese „knobs“ sind an der Zytoadhärenz der pRBC im Verlaufe des asexuellen Entwicklungszyklus des Parasiten, so wird angenommen, wesentlich beteiligt. Fehlt ihnen das funktionsfähige KAHR-Protein, wird zwar noch PfEMP 1 exprimiert, die Fähigkeit zur stabilen Zytoadhärenz unter Flussbedingungen nimmt allerdings ab (Waller et al. 1999).

Durch den Mechanismus der Zytoadhärenz binden die pRBC, die reife Parasiten enthalten, an Endothelien von Venolen und Kapillaren verschiedener Organe mit der Folge, dass diese reifen Parasiten aus der systemischen Zirkulation verschwinden und damit im peripheren Blut nicht nachweisbar sind. Die Zytoadhärenz ist ein bedeutender pathophysiologischer Mechanismus von *P. falciparum*. Sie dient wahrscheinlich dazu, der Abwehr durch die Milz zu entgehen. Parasitierte RBCs, die reifere Stadien enthalten, sind steifer und weniger verformbar. Im Gegensatz zu den Ringstadien und frühen Trophozoiten enthaltenden Erythrozyten, die kein Antigen exprimieren und damit auch nicht zytoadhärieren, können diese die Milzzirkulation nicht oder nur erschwert passieren. Zusätzlich hilft die Sequestration auch die antikörpervermittelte Phagozytose durch Milzmakrophagen und die zelluläre Abwehr durch die Milz zu verhindern. Sie dient dabei auch der Entwicklung des Parasiten in einer sauerstoffarmen Umgebung.

Darauf begründet sich auch die Annahme oder Beobachtung, dass in verschiedenen Fällen von humanen *P. falciparum*-Infektionen oder auch im Tiermodell alle Parasitenstadien im peripheren Blut gefunden wurden (Israeli et al. 1987, Cook et al. 1998, Grobusch et al. 2003, Demar et al. 2004). Man geht davon aus, dass *P. falciparum* in Milzlosen durch verminderte „knob“-Expressierung gar nicht oder zumindest weniger zytoadhärieren (Barnwell et al. 1982/1983, Ho et al. 1996).

Trotzdem scheint dies nicht generell der Fall zu sein. Es existieren auch Berichte von Plasmodium-falciparum-Infektionen von Splenektomierten, in denen die Parasiten dennoch zytoadhärieren und die Fähigkeit zur Zytoadhärenz erst nach mehreren Passagen in splenektomierten Tieren verloren geht oder die Zytoadhärenz in vitro auch ohne „knobs“ möglich ist (Barnwell et al. 1982/1983, Udomsangpetch 1989, Looareesuwan et al. 1993, Ho et al. 1996, Pongponratn et al. 2000).

Im Vergleich fanden wir in unserer Kohorte, dass ältere Parasitenstadien nicht nur in Splenektomierten/Milzlosen, sondern auch in milzgesunden Kontrollen im peripheren Blut vorkamen. Jedoch konnten wir darüber hinaus feststellen, dass reifere Parasitenstadien mit Ausnahme des Stadiums 6 (Schizonten) häufiger in Milzlosen als in Kontrollen vorkamen. Dies war nicht abhängig von der totalen Parasitenanzahl im Ausstrich.

Daraus könnte man schließen, dass, wenn die Parasiten in Milzgesunden zytoadhärieren, wie es für sie typisch wäre, sie es auch in Milzlosen tun. Da keine Gewebeproben entnommen wurden kann man dieses nicht beweisen.

Jedoch zytoadhärieren Parasiten in Milzgesunden scheinbar häufiger. Dies könnte mit dem beschriebenen Effekt der Umgehung der Milz, aber auch mit dem modulierenden Effekt der Milz auf die Expressierung von Antigenen, wie im Affenmodell gezeigt wurde (Barnwell et al. 1982/1983), zu tun haben. Dass in Milzlosen damit während Parasitämien häufiger ältere Stadien vorkommen, könnte somit an dem verlorenen modulierenden Effekt sowie an der fehlenden Milzabwehr liegen.

Wenn man davon ausgeht, dass die Expressierung von Oberflächenantigenen wichtig für die Zytoadhärenz ist, könnte man sagen, dass in Milzlosen möglicherweise seltener zytoadhärenzförderndes Oberflächenantigen exprimiert wird. Nach einer Hypothese von Saul 1999 sollen die varianten Oberflächenantigene jedoch erst in zweiter Linie Zytoadhärenz vermitteln. Ihre Aufgabe haben sie vorwiegend in der Induktion von antikörpervermittelter Immunabwehr (Saul 1999). Deshalb variieren die Parasiten auf Immunselektionsdruck hin, der auch durch die Milz bereitgestellt wird, ihr Antigen möglicherweise in Milzgesunden häufiger.

Dadurch wird auf zwei Wegen erreicht, die Immunabwehr zu umgehen: einmal durch Zytoadhärenz und zum anderen durch die Verzögerung der Antikörperbildung. Jedoch ist der Parasit nicht darauf ausgerichtet, den Wirt zu töten, da damit auch sein Überleben gefährdet wäre. Deshalb wird ein Teil der Parasiten vielleicht weniger/kein Antigen (z. B. PfEMP 1) exprimieren und damit nicht zytoadhärieren (Saul 1999). Dies würde zum Gleichgewicht zwischen Wachstumsförderung und Abwehr in Milzgesunden führen und auch erklären, warum späte Parasitenstadien in dieser Gruppe im peripheren Blut vorkommen.

Versucht man diese Hypothese auf die Milzlosen zu übertragen, würde dies dazu führen, dass in Milzlosen durch die fehlende oder verminderte Modifikation der Antigenexpression und „knob“-Ausbildung natürlich weniger Parasiten zytoadhärieren. Das hätte zur Folge, dass mehr ältere Stadien im Blut auftauchen. Um das Gleichgewicht zwischen Wachstum und Abwehr zu erhalten variieren diese Antigene, auch beeinflusst durch die fehlende Expressionsmodulation der Milz nicht so oft, was zu besserer Antikörperbildung führen könnte und damit die Abwehr stärkt. Im Affenmodell z. B. zeigten Splenektomierte höhere totale Antimalaria-Antikörpertiter nach Re-Infektion (Gysin et al. 1982).

Gesondert betrachtet werden müssen die zwei folgenden Phänomene, die wir in unserem Klientel beobachtet haben. Erstens kommen Schizonten (Stadium 6) allein betrachtet, wenn Parasitämie vorhanden ist, in beiden Untersuchungsgruppen gleichhäufig vor. Man könnte annehmen, dass dies daran liegt, dass diese Stadien generell nicht zytoadhärieren, was den gängigen Meinungen in der Literatur widerspricht (z. B. Ho et al. 1992, Ramasamy 1998). Wenn man in unserem Fall das Auftreten älterer Parasitenstadien als Patientenmerkmal modifiziert nach Parasitämiehäufigkeit betrachtet, stellt man fest, dass zumindest die Stadien 4-6 zusammen häufiger in Milzlosen vorkommen. Dies würde im Umkehrschluss bedeuten, dass die Schizonten doch zytoadhärieren. Dafür könnte ein anderer unbekannter Mechanismus oder andere spezielle Oberflächenantigene/-rezeptoren verantwortlich sein.

Es wäre auch möglich, dass vorherige Stadien/reife Trophozoiten, egal ob in der Zirkulation oder nicht, aus unbekannten Gründen, vielleicht mediatorvermittelt einen plötzlichen Wachstumsschub erfahren, was deren Auftretenswahrscheinlichkeit im Blut erhöht. Dies wäre vergleichbar mit einer der Hypothesen von Grobusch et al. 2003, in deren Fallbericht eine massive Gametozytämie beobachtet wurde, deren Ursache unklar ist (Grobusch et al. 2003). Wäre das gleichhäufige Vorkommen des Stadium 6 ein Effekt, der von den erhöhten Zahlen des Stadiums 4 bzw. 5 im peripheren Blut beeinflusst ist, würde das eher für die Theorie der nichtvorhandenen Zytoadhärenz sprechen.

Da aber diese Stadien in Milzlosen häufiger vorkommen, ist dies relativ unwahrscheinlich. Ebenso wenig scheint die fehlende Milzclearance vorheriger asexueller Stadien die Ursache zu sein.

Das zweite Phänomen betrifft das Stadium 4 (früher Trophozoit), bei dem zunächst ein Vorkommen, abhängig von der Parasitämiehöhe sowie abhängig und unabhängig vom Milzstatus gezeigt werden konnte. Wenn man dagegen das Auftreten dieses Stadiums unabhängig von der totalen Parasitenanzahl im Ausstrich betrachtet, kommt das Stadium 4 häufiger in Milzlosen vor. Die Ergebnisse in 5.3.3. und 5.3.4. könnten durch die in Milzlosen durchschnittlich höheren Parasitämien beeinflusst worden sein. Man kann also davon ausgehen, dass das Stadium 4, wie in den Berechnungen unabhängig von der Parasitämie gezeigt wurde, häufiger in Milzlosen vorkommt.

Dies spricht auch gegen einen „Sättigungsmechanismus“ der Zytoadhärenz. Es konnte keine eindeutige Abhängigkeit des Auftretens älterer Parasitenstadien von der Parasitämiehöhe gezeigt werden. Dem zu Folge ist es auch nicht anzunehmen, dass ältere Stadien nur im Blut auftauchen, wenn alle endothelialen Rezeptoren besetzt sind.

Insgesamt ist festzustellen, dass ältere Parasitenstadien zwar auch in milzgesunden Personen im peripheren Blut, im Gegensatz zu den bisher gängigen Meinungen in der Literatur (Smith et al. 1995, Miller et al. 2002 und korrespondierende Referenzen), zu finden sind.

Sie treten dennoch gehäuft in Milzlosen auf, wenn Parasitämie vorhanden ist. Dies lässt darauf schließen, dass die Milz einen modulierenden Effekt auf die Antigenexpression haben muss und damit die Zytoadhärenz von *Plasmodium falciparum* beeinflusst wird. Dass ältere Parasitenstadien darüber hinaus auch in Milzgesunden vorkommen, stärkt aber auch die Hypothese, dass die von *Plasmodium falciparum* exprimierten Antigene nicht nur für die Zytoadhärenz wichtig sind. Sie haben wahrscheinlich hauptsächlich eine antigene, antikörper- bzw. immuninduzierende Funktion.

6.5. HIV- und Malaria-Co-Infektion

HIV/AIDS- und Malaria-Co-Infektionen sind angesichts hoher Prävalenzen beider Erkrankungen im südlichen Afrika häufig der Fall (Hoffmann et al. 1999, French und Gilks 2000). Es sollte daher hier versucht werden zu klären, ob ein Zusammenhang zwischen HIV-Infektion und Malaria bestehen könnte. Dies wurde für andere Infektionskrankheiten wie z. B. Tuberkulose, Herpesvirus-Infektion und andere parasitäre Erreger (*Leishmania donovani*, *Toxoplasma gondii*) bereits nachgewiesen (Chandramohan und Greenwood 1998, Xiao et al. 1998). Das HI-Virus befällt bevorzugt CD 4+ T-Helferzellen, die auch bei der Malariainfektion eine wichtige Rolle z. B. in der Makrophagenaktivierung, Zytokinproduktion und damit der Abwehr der Erkrankung spielen. Umgekehrt kann durch deren Aktivierung die Empfänglichkeit für die HIV-1-Infektion gesteigert werden (Butcher 1992, Hoffmann et al. 1999). Dennoch konnte bisher, außer bei Schwangeren, ein Zusammenhang zwischen HIV-Infektion und Malaria nicht oder nicht sicher nachgewiesen werden (French und Gilks 2000, Good et al. 2004, Ter Kuile et al. 2004).

In Malawi betrug die geschätzte HIV-Prävalenz Ende 1999 bei Erwachsenen im Alter zwischen 15 und 49 Jahren 16 % (U.S. Census Bureau et al. 1999), 2001 lag sie bei ca. 15 % (The National AIDS Control Programme Malawi 2001). Ende 2003 betrug die geschätzte Prävalenzrate der Erwachsenen 14,2 % (UNAIDS 2004).

In unserer Studiengruppe lag die Prävalenz zu Beginn der Untersuchung bei 20,16 %, am Ende bei 35,24 %. Diese im Vergleich zu den landesweiten Schätzungen erhöhten Werte ergeben sich aus dem geringen Stichprobenumfang. Zusätzlich schließen die zum Ende des Untersuchungszeitraumes berechneten Werte wahrscheinlich HIV-Negative aus, die zu diesem Zeitpunkt nicht untersucht wurden. Das bedeutet, dass ursächlich für die hohe HIV-Prävalenz in dieser Untersuchungsgruppe eher eine uneinheitliche Methodik zur HIV-Statusbestimmung angesehen werden muss.

Auch kann ein Einfluss des Milzstatus auf die HIV-Prävalenz bzw. Inzidenz ausgeschlossen werden, da sowohl am Anfang als auch am Ende des Untersuchungszeitraumes die Anzahl der HIV-Positiven in den beiden Gruppen (Splenektomien und Kontrollen) nahezu gleich war.

Die Häufigkeit von Parasitämien während des Untersuchungszeitraumes betrug bei HIV-Positiven unabhängig vom Milzstatus 2,25 mal bzw. 28 % bezogen auf die individuelle Teilnahmehäufigkeit an den monatlichen Untersuchungen. Sie liegt damit im Bereich der Inzidenz von Kontrollen. Abhängig vom Milzstatus ergeben sich in der Gruppe der HIV-Positiven jedoch signifikante Unterschiede zwischen Splenektomierten und Kontrollen. Man kann insgesamt sagen, dass der HIV-Status, wie in der Literatur beschrieben, keinen Einfluss auf die Parasitämiehäufigkeit zu haben scheint, ganz im Gegensatz zum Milzstatus, wie bereits diskutiert wurde (Butcher 1992, Xiao et al. 1998).

Hinsichtlich der Parasitämiehöhe, bewertet mit der semiquantitativen Analyse, als auch des Vorkommens älterer Parasitenstadien ergeben sich sowohl unabhängig als auch abhängig vom Milzstatus keine signifikanten Unterschiede zwischen HIV-Positiven und HIV-Negativen. HIV-Positive haben also weder höhere Parasitämien noch häufiger ältere Parasitenstadien im Blut. Auffällig dabei ist aber, dass bei den statistischen Berechnungen für das Vorkommen älterer Parasitenstadien niedrigere p-Werte in Abhängigkeit vom Milzstatus erreicht werden, die jedoch nicht von statistischer Signifikanz sind. Das könnte darauf hindeuten, dass, wie bereits gezeigt wurde, der Milzstatus und nicht der HIV-Status ausschlaggebend für das häufigere Vorkommen von älteren Parasitenstadien ist. Diese Studiengruppe bestätigt also die Annahmen aus der Literatur bzw. Beobachtungen aus anderen Studien, die eher keinen Zusammenhang zwischen Malaria und HIV-Infektion sehen, d. h., die keine höheren Parasitämieraten oder -level beobachten konnten (Butcher 1992, Chandramohan und Greenwood 1998).

Kritisch anzumerken ist, dass diese Studie primär nicht auf die Untersuchung des Zusammenhanges zwischen HIV-Infektion und Malaria ausgelegt war. Die Gruppengröße bzw. die Anzahl der bewerteten Ausstriche der HIV-Positiven ist im Vergleich zu den HIV-Negativen sehr gering. Somit ist auch eine statistisch verlässliche Aussage über den Einfluss der HIV-Infektion auf die Malariainfektion von vornherein als gering anzusehen.

Des weiteren wurden leider keine weiteren Parameter zur Beurteilung der HIV-Erkrankung wie CD 4-Zellzahlbestimmung oder Viruslast im Blut vorgenommen, so dass man keine Aussage über die Progression der HIV-Infektion während/nach einer Malariainfektion treffen kann.

6.6. Schwere der Erkrankung

Verschiedene klinische Fallberichte zeugen davon, dass splenektomierte Patienten empfänglicher für die Entwicklung einer Malariainfektion und schwererer Erkrankungen sind. Dies ist unabhängig davon, ob zuvor durch wiederholte Infektionen eine sogenannte Semiimmunität erworben wurde (Demar et al. 2004, Grobusch et al. 2003; Pongponratn et al. 2000, Israeli et al. 1987, Maharaj et al. 1982).

Auch in Tiermodellen sind Splenektomierte empfänglicher für schwere, tödlich verlaufende Malaria und chronische Infektionen bzw. Parasitenpersistenz (Looareesuwan et al. 1993).

Im Gegensatz dazu sprechen diese und andere Berichte zwar von höheren Parasitämieraten, dem Nachweis von multiplen Entwicklungsstadien im peripheren Blut und verlängerter Parasitämie. Dennoch gehen diese Befunde nicht mit den Zeichen einer schweren Malaria einher (Boone und Watters 1995). Die Milz scheint also nicht essentiell für die Parasitenclearance in Semiimmunen zu sein (Looareesuwan et al. 1993).

Bekannt ist, dass im Rahmen von Infektionen nach Splenektomie dem Verlust der Milzfunktionen eine entscheidende Rolle zukommt. Besonders zeigt sich dies anhand des sogenannten OPSI-Syndroms, das vorwiegend durch polysaccharid-bekapselte Bakterien wie Pneumokokken (verantwortlich für ca. 50 – 80 % der Fälle) aber auch andere Bakterien wie Staphylokokken, Clostridien, E. coli, Salmonellen sp. verursacht wird. Diese können bei splenektomierten Patienten schwerwiegende bis tödlich verlaufende Infektionen (Mortalität des vollentwickelten OPSI-Syndroms beträgt 50 – 70 %) auslösen (Styrt 1990). Dies liegt an dem besonderen „Milieu“, das die Milz im Rahmen dieser Infektionen zur Verfügung stellt. Besonders in der Marginalzone existieren spezialisierte Zellen, die die für diese Infektionen wichtige T-Zell-unabhängige Antikörperproduktion induzieren können (Cuschieri und Forbes 1994). Außerdem ist die Milz wichtig für die Abwehr intrazellulärer Erreger, wie im Falle der Malaria. Dabei trägt die Milz durch verschiedene Mechanismen wie rheologische Klärung vermindert verformbarer Erythrozyten, antikörpervermittelte Phagozytose, Bereitstellung von Effektorzellen der zellulären und humoralen Abwehr (T- und B-Lymphozyten bzw. differenzierte Plasmazellen) und durch Zytokinproduktion wesentlich zur protektiven Immunität bei. Sie vermittelt dadurch aber auch die Auslösung inflammatorischer Reaktionen, die zu Krankheitssymptomen führen. Ebenso scheint die Milz die Exprimierung von varianten Antigenen auf der Oberfläche von pRBC zu beeinflussen.

Diese sind unter anderem für die Zytoadhärenz von reifen Parasitenstadien verantwortlich, einer wesentlichen Eigenschaft von *P. falciparum*, bei dem reife Parasiten an Endothel verschiedener Organe binden.

Wir konnten in dieser Kohorte zeigen, dass asymptomatische *P.-falciparum*-Infektionen gleichhäufig in Splenektomierten sowie in Kontrollen vorkamen.

Man kann davon ausgehen, dass alle Personen, die in einer für *P. falciparum* endemischen Region leben, vor der Splenektomie mehrere Infektionen durchgemacht und damit eine Semiimmunität bzw. ein immunologisches Gedächtnis für die lokal zirkulierenden Parasitenarten erworben haben (Cook et al. 1998). Es scheint also möglich zu sein, dass dieses Gedächtnis zumindest teilweise auch ohne Milz persistiert oder von anderen Organen übernommen wird. Dafür spräche auch die Tatsache, dass es typisch für Malariainfektionen und die dagegen erworbene Immunität ist, zunächst die Symptome der Infektion zu kontrollieren und nicht die Infektion an sich, d. h. die Parasitämie (Struik und Riley 2004).

Dies zeigt sich auch daran, dass in keiner der Untersuchungsgruppen während des gesamten Zeitraumes eine schwere Malaria beobachtet wurde. Was aber führt zu schwerer Malaria? Hier scheinen verschiedene Mechanismen involviert zu sein, die die Interaktion zwischen Parasit und Wirt bedingen. Zum einen kommt es während der Akutinfektion zu einer verstärkten B-/T-Zellaktivierung. Dabei werden vor allem CD 4+ Th-1-Zellen mit nachfolgendem Anstieg von proinflammatorischen Zytokinen sowie einer Makrophagen- und Phagozytoseinduktion aktiviert. Die Zytokine TNF α , IL 1, IFN γ sind für die starke entzündliche Reaktion, vermehrte vaskuläre Permeabilität und damit für Symptome wie Fieber, Lungenödem etc. mit verantwortlich. Des weiteren können sie die Expressierung von endothelialen Liganden induzieren, die in die Zytoadhärenz involviert sind. Dabei handelt es sich um einen weiteren Mechanismus, der neben dem Rossetting (Bindung pRBC an nicht parasitierte Erythrozyten) zur Symptombildung und schweren Malaria beiträgt (Cook 1998, Chen et al. 2000, Pongponratn 2000, Serghides und Kain 2005). Durch diese pathophysiologischen Eigenschaften von *P. falciparum* kommt es zur Gefäßobstruktion, was z. B. eine Rolle bei der Entwicklung zerebraler Malaria (Looareesuwan et al. 2003) und beim Nierenversagen spielt. Die Milz ist dabei direkt bzw. indirekt an der Zytoadhärenz beteiligt.

Zum einen fördert sie durch einen unbekannten Mechanismus die Expressierung zytoadhärenzfördernder parasitärer Oberflächenantigene (vgl. 6.4.). Die von ihr produzierten Zytokine stehen in Zusammenhang mit der Ausbildung endothelialer Liganden.

Eine weitere entscheidende Rolle in der Pathogenese der schweren Malaria spielt das sogenannte Malariatoxin oder GPI, über das verschiedene wichtige parasitäre Proteine wie MSP 1/2 mit der Zellmembran der RBC verankert sind (Schofield und Hackett 1993, Naik et al. 2000). Diese werden unter anderem bei der Schizontenruptur freigesetzt und können eine direkte Wirtschädigung auslösen. Weiterhin können sie über Zytokininduktion die endotheliale Ligandenexpression und Sequestration verbessern sowie klinische Symptome auslösen (Ramasamy 1998, Chen et al. 2000). Daneben wird auch der Parasitärmehöhe eine Beteiligung an der Entwicklung einer schweren Malaria zugeschrieben, obwohl auch hohe Parasitärmien mit relativ wenig Symptomatik toleriert werden können (Whyler 1983, Silamut und White 1993, Serghides und Kain 2005).

Anhand unserer Beobachtungen kann man also davon ausgehen, dass:

1. die zuvor erworbene Teilimmunität und die antitoxische Immunität dafür verantwortlich sind, die Schwere der Erkrankung zu kontrollieren, indem es bei Re-Infektionen verstärkt zur CD 4⁺ Th-2-Zellaktivierung kommt. Es werden spezifische Antikörper gegen verschiedene parasitäre Proteine sowie Antikörper gegen GPI gebildet, was insgesamt die inflammatorische Zytokinproduktion herunterreguliert (vgl. Schofield und Hackett 1993, Ramasamy 1998, Naik et al. 2000). Dabei kann die bis dahin erworbene Immunität auch ohne Milz erhalten bleiben oder wird nur zeitweilig unterbrochen (vgl. Petersen et al. 1992, Looareesuwan et al. 1993). Dies scheint möglich, da das immunologische Gedächtnis aus der Milz in andere periphere Organe gewandert zu sein scheint und vermutlich auch durch die zu erwartenden immer wiederkehrenden Re-Stimulationen.
2. die Zytoadhärenz zwar von der Milz beeinflusst wird, das aber eben nicht die alleinige Rolle der Zytoadhärenz vermittelnden Antigene ist (vgl. Saul 1999). Denn, wie in 5.3. bereits diskutiert wurde, kommen späte Entwicklungsstadien, die normalerweise zytoadhärieren, auch im peripheren Blut von Milzgesunden vor.
3. die Zytoadhärenz, vorausgesetzt sie kommt vor, in unserem Klientel nicht die Rolle in der Entwicklung von schwerer Malaria spielt, denn Zytoadhärenz/Sequestration ist in den meisten Fällen nicht mit einer schweren Infektion vergesellschaftet (vgl. Miller et al. 2002).

4. die Parasitämiehöhe und das Auftreten später Parasitenstadien nicht als Indikator für die Krankheitsschwere angesehen werden können. Milzlose haben höhere Parasitämien als Milzgesunde sowie häufiger ältere Parasitenstadien im Blut erkranken aber dennoch nicht häufiger an schwerer Malaria.

Alle anderen postulierten klinischen Stadien (RP, MM, PM) kommen im Gegensatz zu asymptomatischen Infektionen und schwerer Malaria häufiger in Splenektomierten vor.

Diese Ergebnisse lassen sich mit den bereits getroffenen Feststellungen nur teilweise erklären. Das häufigere Vorkommen von Residualparasitämien deckt sich mit Beobachtungen, dass Splenektomierte mehr Zeit benötigen um die Parasiten aus der Zirkulation zu entfernen. Die Parasiten persistieren bei ihnen länger im Blut oder können gar nicht komplett entfernt werden (Grobusch et al. 2003, Demar et al. 2004 u.a.). Es ist auch möglich, dass die Parasiten durch die Immunantwort bzw. medikamentöse Therapie bereits abgetötet wurden (tote Parasiten sind schwerer zu identifizieren) aber durch den fehlenden Milzfilter nicht aus der Zirkulation entfernt werden können (vgl. Chotivanich et al. 2000).

Dass die wahrscheinliche Malaria und die bewiesene Malaria häufiger in Splenektomierten vorkommt, kann man damit erklären, dass, wie schon aus anderen Infektionen und Berichten bekannt ist, die Milz dennoch eine wichtige Rolle in der Immunabwehr der Malariainfektion spielt. Wie bereits diskutiert, stellt sich das, für das Überleben des Parasiten notwendige Gleichgewicht zwischen Immunität und Infektion ein. Jedoch fehlt die Milz als Faktor in der Reduktion der Parasitämie (Milzlose haben häufigere und höhere Parasitämien) und damit in der Symptombekämpfung. Das bedeutet, dass die Malariainfektion auch in unserem Klientel eher kontrolliert bzw. toleriert als verhindert wird (vgl. Struik und Riley 2004). Dabei hängt allerdings die antiparasitäre Komponente der Anti-Malariaimmunität bzw. die Immunität gegenüber unkomplizierter Malaria und deren Aufrechterhaltung stark von der Milz ab.

7. Schlussfolgerungen

Anhand der in dieser Studie durchgeführten Analysen und gemachten Beobachtungen kann man zunächst hinsichtlich der angewandten Methodik sagen, dass die semiquantitative Analyse im Dicken Tropfen zwar ungenau, sie aber bezüglich der Selektion und dem Zeit- bzw. Arbeitsaufwand gerechtfertigt ist. Die tatsächliche quantitative Parasitämiebestimmung ist in ihrer Durchführung einfach, praktikabel und wurde bereits in anderen vergleichbaren Studien angewendet. Insgesamt wäre es für zukünftige Projekte besser, alle Ausstriche nach beiden Methoden oder nur nach der tatsächlichen quantitativen Parasitämiebestimmung zu bewerten. Dadurch könnten Selektionen, die hier auf Grund der Menge an Untersuchungsmaterial notwendig waren, reduziert werden.

Die Stadieneinteilung/-bestimmung wurde ebenfalls, wenn auch modifiziert, in anderen Studien vorgenommen. Sie ist ebenfalls praktisch gut durchführbar und bezüglich der Parasiteneigenschaften nachzuvollziehen. Sie kann weiterhin so angewendet werden.

Für die Milzfunktion in Malariainfektionen kann man sagen, dass die Milz mit all ihren immunologischen Eigenschaften für die antiparasitäre Immunität wichtig ist bzw. um die Parasitämie zu limitieren, da Milzlose zu häufigeren und höheren Parasitämien neigen.

Des weiteren hat die Milz mit Sicherheit einen Einfluss auf die Exprimierung zytoadhärenzfördernden Antigens auf der Oberfläche parasitierter Erythrozyten, denn Splenektomierte haben während Parasitämien häufiger ältere Parasitenstadien im Blut. In welchem Maße und auf welche Art und Weise ist dennoch bis jetzt nicht geklärt, denn auch in milzgesunden Kontrollen konnten ältere Parasitenstadien nachgewiesen werden.

Dafür wäre es interessant, die Oberflächenstruktur der pRBCs der Splenektomierten im Vergleich zu Kontrollen, z. B. mittels Elektronenmikroskopie, genauer zu untersuchen. Auch eine Bestimmung der Verteilung von Oberflächenantigenen mittels Antikörpermarkierung o. ä. könnte dabei hilfreich sein. Vielleicht muss man auch die Pathophysiologie bzw. die Funktion der Sequestration/Zytoadhärenz der *P. falciparum*-Parasiten überdenken. Ist sie wirklich hauptsächlich dazu da, die Milzabwehr zu umgehen und eine Antikörperinduktion zu verhindern? Wenn ja, warum sind dann ältere Parasitenstadien auch in Milzgesunden zu finden? Es spricht eher für ein Gleichgewicht zwischen Abwehr und Wirt, um chronische Infektionen zu produzieren und damit das Überleben des Parasiten zu sichern.

Das lässt sich auch anhand der klinischen Präsentation in unserem Patientenkollektiv zeigen, wo schwere Malariainfektionen, die den Wirt töten könnten, nicht beobachtet wurden und asymptomatische Infektionen gleichhäufig in Splenektomierten und Kontrollen vorkamen. Es bedeutet aber auch hinsichtlich der Milzfunktion, dass diese nicht essentiell für die Verhinderung einer schweren Malariainfektion ist, sondern dass hier eher die vom Patienten erworbene Semiimmunität und dabei besonders die antitoxische Immunität zur Reduktion von klinischen Symptomen von Bedeutung ist. Diese kann auch ohne Milz erhalten werden. Jedoch muss einschränkend gesagt werden, dass dadurch, dass Milzlose häufiger an wenig symptomatischen Infektionen leiden, die Milz dennoch für die Abwehr wichtig ist. Dies ist aber, wie bereits erörtert, mehr hinsichtlich der antiparasitären Komponente der Fall.

Des Weiteren lässt sich schlussfolgern, dass weder die Parasitämiehöhe noch das Vorkommen älterer Stadien im peripheren Blut Einfluss auf die Schwere der Erkrankung zu haben scheinen.

Bezüglich der HIV- und Malaria-Co-Infektion unterstützen unsere Beobachtungen eher die Behauptungen, die keinen Zusammenhang zwischen beiden Erkrankungen sehen, denn HIV-Positive haben weder häufiger Parasitämien, noch höhere Parasitämien oder mehr ältere Parasitenstadien im Blut. Einschränkend muss gesagt werden, dass für eine genaue statistische Evaluation die Patientengruppen zu klein waren. Der HIV-Status beeinflusst aber umgekehrt weder die Parasitämieinzidenz, -höhe und das Vorkommen älterer Stadien, da beide Gruppen nahezu die gleiche Anzahl HIV-positiver Patienten hatten. Weitere Untersuchungen, die den Zusammenhang beider Erkrankungen klären könnten, sind daher notwendig.

Insgesamt kann man sagen, dass die Milz weiterhin ein wichtiges Organ in der Abwehr der Malaria darstellt, besonders in der antiparasitären Komponente der Abwehr, aber auch in der Beeinflussung der Zytoadhärenz von *P. falciparum*. Die genauen Mechanismen sind aber weiterhin unklar und bedürfen weiteren Untersuchungen. Man sollte aber anhand dieser Beobachtungen eher zurückhaltend mit der Splenektomie in Malariaendemiegebieten sein.

8. Literatur- und Quellenverzeichnis

Balsalobre B, Carbonell-Tatay F (1991)

Cellular immunity in splenectomized patients

J. Invest. Allergol. Clin. Immunol. 1 (4): 235-238

Barnwell JW, Howard RJ, Miller LH (1982)

Altered Expression of Plasmodium knowlesi Variant Antigen on the Erythrocyte Membrane in Splenectomized Rhesus Monkeys

The Journal of Immunology 128 (1): 224-226

Barnwell JW, Howard RJ, Coon HG, Miller LH (1983)

Splenic Requirement for Antigenic Variation and Expression of the Variant Antigen on the Erythrocyte Membrane in Cloned Plasmodium knowlesi Malaria

Infection and Immunity 40 (3): 985-994

Barnwell JW, Howard RJ, Miller LH (1983)

Influence of the spleen on expression of surface antigens on parasitized erythrocytes

Malaria and the Red Cell. Pitman. London (Ciba Foundation symposium 94): 117-136

Baruch DI, Ma XC, Singh HB, Bi X, Pasloske B, Howard RJ (1997)

Identification of a Region of PfEMP 1 that mediates Adherence of P. falciparum infected Erythrocytes to CD 36: Conserved Function with Variant Sequence

Blood 90 (9): 3766-3775

Bolad A, Berzins K (2000)

Antigenic Diversity of Plasmodium falciparum and Antibody-Mediated Parasite Neutralization

Scand. J. Immunol. 52: 233-239

Boone KE, Watters DAK (1995)

The incidence of malaria after splenectomy in Papua New Guinea

BMJ 311: 1273

Bordmann G, Favre N, Rudin W (1997)

Malaria toxins: effect on murine spleen and bone marrow cell proliferation and cytokine production in vitro

Parasitology 115: 475-483

Borst P, Bitter W, McCulloch R, VanLeeuwen F, Rudenko F (1995)

Antigenic Variation in Malaria

Cell 82: 1-4

Breman (2001)

The Ears of the Hippopotamus: Manifestation, Determinants and Estimates of the Malaria Burden

American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 34 (1/2): The Intolerable Burden of Malaria: A new look at the numbers: 1-11

Burkhard F (1992)

Mikrobiologische Diagnostik

Thieme Verlag 1992: 401-402

Butcher GA (1992)

HIV and Malaria: A Lesson in Immunology?

Parasitology Today 8 (9): 307-311

Chandramohan D, Greenwood BM (1998)

Is there any interaction between human immunodeficiency virus and Plasmodium falciparum?

International Journal of Epidemiology 27: 296-301

Chen Q, Schlichtherle M, Wahlgren M (2000)

Molecular Aspects of Severe Malaria

Clinical Microbiology Reviews 13 (3): 439-450

Chotivanich K, Udomsangpetch R, McGready R, Proux S, Newton P, Pukrittayakamee S, Looareesuwan S, White NJ (2002)

Central role of the spleen in malaria parasite clearance

J. Infect. Dis. 185 (10): 1538-1541

Cook GC (1998)

Manson's Tropical Diseases

20-th Edition, WB Saunders Company Ltd: 1087-1164

Cuschieri A, Forbes CD (1994)

Anatomy of the human spleen, Chapter 1 and Functions of the spleen, Chapter 2

Blackwell Scientific Publications, Oxford: 1-50

Demar M, Legrand E, Hommel D, Esterre P, Carme B (2004)

Plasmodium falciparum Malaria in Splenectomized Patients : Two Case Reports In French Guiana and Literature Review

Am. J. Trop. Med. Hyg. 71 (3): 290-293

De Moura Carvalho LJ, Alves FA, De Oliveira SG, Del Rio do Valle R, Fernandes AAM, Muniz JAPC, Daniel-Ribeiro CT (2003)

Severe Anemia Affects both Splenectomized and Nonsplenectomized Plasmodium falciparum-infected Aotus infulatus Monkeys

Mem. Inst. Oswaldo Cruz 98 (5): 679-686

D'Imperio Lima MR, Alvarez JM, Furtado GC, Kipnis TL, Coutinho A, Minoprio P (1996)

Ig-Isotype Patterns of Primary and Secondary B Cell Responses to Plasmodium chabaudi chabaudi Correlate with IFN- γ and IL-4 Cytokine Production and with CD45RB Expression by CD 4+ Spleen Cells

Scand. J. Immunol. 43: 263-270

Engwerda CR, Beattie L, Amante FH (2005)

The importance of the spleen in malaria

Trends in Parasitologie 21 (2): 75-80

Fernandez V, Treutiger CJ, Nash GB, Wahlgren M (1998)
Multiple Adhesive Phenotypes Linked to Rosetting Binding of Erythrocytes in Plasmodium falciparum Malaria
Infection and Immunity 66 (6): 2969-2975

French N, Gilks CF (2000)
HIV and malaria, do they interact?
Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene 94: 233-237

Gallup JL, Sachs JD (2001)
Economic Burden of Malaria
American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 34 (1/2): The Intolerable Burden of Malaria: A new look at the numbers: 85-96

Good MF, Staniscic D, Xu H, Elliot S, Wykes M (2004)
The immunological challenge to developing a vaccine to the blood stages of malaria parasites
Immunological Review 201: 254-267

Greenwood B, Mutabingwa T (2002)
Malaria in 2002
Nature 415: 670-672

Grobusch MP, Borrmann S, Omva J, Issifou S, Kremsner PG (2003)
Severe malaria in a Gabonese woman
Wien. Klin. Wochenschr. 115 (3): 63-65

Guyatt HL, Snow RW (2001)
The Epidemiology and Burden of Plasmodium falciparum Related Anaemia among Pregnant Women in Sub-Saharan Africa
American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 34 (1/2): The Intolerable Burden of Malaria: A new look at the numbers: 36-44

Gysin J, Fanduer T, Pereira da Silva L (1982)
Kinetics of the Humoral Immune Response to Blood-Induced Falciparum Malaria in the Squirrel Monkey Saimiri Sciureus
Ann. Immunol. (Inst. Pasteur) 133D: 95-102

Ho M, White NJ, Looareesuwan S, Wattanagoon Y, Lee SH, Walport MJ, Bunnag D, Harinasuta T (1990)
Splenic Fc- γ -Receptor Function in Host Defense and Anemia in Acute Plasmodium falciparum Malaria
The Journal of Infectious Diseases 161: 555-561

Ho M, Bannister LH, Looareesuwan S, Suntharasamai P (1992)
Cytoadherence and Ultrastructure of Plasmodium falciparum-Infected Erythrocytes from a Splenectomized Patient
Infection and Immunity 60 (6): 2225-2228

Ho M, White NJ (1999)
Molecular Mechanisms of Cytoadherence in Malaria
Am. J. Physiol. Cell Physiol. 276 (6): 1231-1242

Hoffman IF, Jere CS, Taylor TE, Munthali P, Dyer JR, Wirima JJ, Rogerson SJ, Kumwenda N, Eron JJ, Fiscus SA, Chakraborty H, Taha TE, Cohen MS, Molyneux ME (1999)
The effect of Plasmodium falciparum malaria on HIV-1-RNA blood plasma concentration
AIDS 13: 487-494

Holding PA, Snow RW (2001)
Impact of Plasmodium falciparum on Performance and Learning: Review of The Evidence
American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 34 (1/2): The Intolerable Burden of Malaria: A new look at the numbers: 68-75

Israeli A, Shapiro M, Ephros MA (1987)
Plasmodium falciparum malaria in an asplenic man
Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene 81: 233-243

Kashamuka M, Nzila N, Mussey L, Lubaki N, Quinn TC, Bollinger F, Kumar N (2003)
Short Report: Analysis of Anti Malaria Immune Response during Human immunodeficiency Virus Infection in Adults in Kinshasa, Democratic Republic of the Congo
American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 68 (3): 376-378

Lee SH, Looareesuwan S, Wattanagoon Y, Ho M, Wuthiekanun V, Vilaiwanna N, Weatherall DJ, White NJ (1989)
Antibody-dependent red cell removal during P. falciparum malaria: The clearance of red cells sensitized with an IgG anti-D
British Journal of Haematology 73: 396-402

Langhorne J (2004)
Dendritic cells, pro-inflammatory responses, antigen-presentation in an rodent malaria infection
Immunological Reviews 201: 35-47

Looareesuwan S, Ho M, Wattanagoon Y, White NJ, Warrell DA, Bunnag D, Harinasuta T, Wyler DJ (1987)
Dynamic Alterations In Splenic Function During Acute Falciparum Malaria
N. Engl. J. Med. 317: 675-679

Looareesuwan S, Suntharasamai P, webster HK, Ho M (1993)
Malaria in Splenectomized Patients: Report of Four Cases and Review
Clinical Infectious Diseases 16: 361-366

Maharaj D, McDonald GA, Dobbie JW (1982)
Splenectomy and Blackwater Fever
Br. J. Neonatol. 51: 663-664

McGuire, Hill AVS, Greenwood BM, Kwiatkowski D (1996)
Circulating ICAM-1 levels in falciparum malaria are high but unrelated to disease severity
Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene 90: 274-276

Miller LH, Baruch DI, Marsh K, Doumbo OK (2002)
The pathogenic basis of malaria
Nature 415: 673-679

Miksits, Hahn (2004)

Basiswissen Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie

3. Auflage, Springer Verlag 2004: 17-39

Morales-Betoulle ME, Goguet de la Salmoniere YO, Zwetyenga J, Lescanf C, Jouin H, Michel CM (1998)

Plasmodium falciparum: Immune Pressure in Saimiri sciureus Monkeys Can Select for a Parasite Population Inducing a Protective Immunity That is not Controlled by Antibody

Experimental Parasitology 90: 49-57

Morrot A, Zavala F (2004)

Effector and memory CD 8+ T cells as seen in immunity to malaria

Immunological Reviews 201: 291-303

Murphy SC, Breman JG (2001)

Gaps in the Childhood Malaria Burden in Africa Cerebral Malaria, Neurological Sequelae, Anaemia, Respiratory Distress, Hypoglycaemia and Complications of Pregnancy

American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 34 (1/2): The Intolerable Burden of Malaria: A new look at the numbers: 57-67

Nahrevanian H, Dascombe MJ (2001)

Nitric oxide and reactive nitrogen intermediates during lethal and nonlethal strains of murine malaria

Parasite Immunology 23: 491-501

Naik RS, Branch OH, Woods AS, Vijaykumar M, Perkins DJ, Nahlen BL, Lal AA, Cotter RJ, Costello CE, Ockenhouse CF, Davidson EA, Gowda DC (2000)

Glycosylphosphatidylinositol Anchors of Plasmodium falciparum: Molecular Characterization and Naturally Elicited Antibody Response That May Provide Immunity to Malaria Pathogenesis

Journal of Experimental Medicine 192 (11): 1563-1576

Neumann RO, Mayer M (1914)

Wichtige tierische Parasiten und ihre Überträger

Lehmanns medizinische Atlanten, Band XI, J.F. Lehmanns Verlag München: 147-189;

Tafel 13: Abb.: 50, 57, 59, 63, 64, 68; Tafel 15

Peters J, Fowler E, Gattou M, Chen N, Saul A, Cheng Q (2002)

High diversity and rapid changeover of var genes during the acute phase of Plasmodium falciparum infections in human volunteers

PNAS 99 (16): 10689-10694

Petersen E, Hoegh B, Marbiah NT, Hanson AP (1992)

The effect of splenectomy on immunity to Plasmodium malariae and Plasmodium falciparum in a malaria immune donor

Trop. Med. Parasitol. 43: 68-69

Pongponratn E, Riganti M, Harinasuta T, Bunnag D (1989)

Electron Microscopic Study of Phagocytosis in Human Spleen in Falciparum Malaria

Southeast Asian J. Trop. Med. Pub. Hlth. 20 (1): 31-39

Pongponratn E, Viriyavejakul P, Wilairatana P, Ferguson D, Chaisri U, Turner G, Looareesuwan S (2000)

Absence of Knobs on Parasitized Red Blood Cells in a Splenectomized Patient in Fatal *Falciparum* Malaria

Southeast Asian J. Trop. Med. Pub. Hlth. 31 (4): 829-835

Pongponratn E, Turner GDH, Day N, Phu NH, Simpson JA, Stepniewska K, Mai NTH, Vejakul PV, Looareesuwan S, Hien TT, Ferguson DJP, White N (2000)

An Ultrastructural Study of the Brain in Fatal *Plasmodium falciparum* Malaria

American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 69 (4): 345-359

Pye D, O'Brien CM, Franchina P, Monger C, Anders RF (1994)

Plasmodium falciparum Infection in Splenectomized and Intact Guyanan Saimiri Monkeys

Journal Parasitol. 80 (4): 558-562

Ramasamy R (1998)

Molecular basis for evasion of host immunity and pathogenesis in malaria

Biochimica et Biophysica Acta 1406: 10-27

Richie TL, Saul A (2002)

Progress and changes for malaria vaccines

Nature 415: 694-701

Roth EF, Shear HL, Constantini F, Tanowitz HB, Nagel RL (1988)

Malaria in β -thalassemic mice and the effects of the transgenic human β -globin gene and splenectomy

J. Lab. Clin. 111 (1): 35-41

Sachs J, Malaney P (2002)

The economic and social burden of Malaria

Nature 415: 680-685

Saul A (1999)

The Role of Variant Surface Antigens on Malaria-infected Red Blood Cells

Parasitology Today Vol. 15, Nr. 11: 455-457

Scherf A, Hernandez-Rivas R, Buffet P, Bottins E, Benatar C, Puvelle B, Gysin J, Lanzer M (1998)

Antigenic variation in malaria: in situ switching, relaxed and mutually exclusive transcription of var genes during intra-erythrocytic development in *Plasmodium falciparum*

The EMBO Journal 17: 5418-5426

Schmidt LH, Fradkin R, Sesler C, Squirres W, Zeyen P (1987)

Attenuation of the Virulence of the M-Strain of *Plasmodium cynomolgi* During Prolonged Multiplication in Splenectomized Rhesus Monkeys

American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 37 (3): 460-490

Schofield L, Hackett F (1993)

Signal transduction in host cells by a glycosylphosphatidylinositol toxin of malaria parasites

Journal of Experimental Medicine 177: 145-153

Serghides L, Kain KC (2005)

Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ and Retinoid X Receptor Agonists Have Minimal Effects on the Interaction of Endothelial Cells with Plasmodium falciparum-Infected Erythrocytes

Infection and Immunity 73 (2): 1209-1213

Silamut K, White NJ (1993)

Relation of the stage of parasite development in the peripheral blood to prognosis in severe falciparum malaria

Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene 87: 436-443

Smith JD, Chitnis E, Craig AG, Roberts DJ, Hudson-Taylor DE, Peterson DS, Pinches R, Newbold CI, Miller LH (1995)

Switches in Expression of Plasmodium Falciparum var Genes Correlate with Changes in Antigenic and Cytoadherence Phenotypes of Infected Erythrocytes

Cell 82: 101-110

Steketee RW (2001)

The Burden of Malaria in Pregnancy in Malaria-Endemic Areas

American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 34 (1/2): The Intolerable Burden of Malaria: A new look at the numbers: 28-35

Steverson MM, Riley EM (2004)

Innate Immunity to Malaria

Nature Reviews Immunology 4: 169-180

Struik SS, Riley EM (2004)

Does malaria suffer from lack of memory?

Immunological Reviews 201: 268-290

Styrt B, MD (1990)

Infection Associated with Asplenia: Risks, Mechanisms and Prevention

The American Journal of Medicine 88: 33-42

Suparggiyono, Cox (1997)

Killing of Blood Stage Plasmodium vinckei petteri by Spleen Macrophages through L-Arginine Dependent Mechanism

Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health 28 (3): 489-495

Ter Kuile FO, Parise ME, Verhoeff FH, Udhayakumar V, Newman RD, VanEyck AM, Rogerson SJ, Steketee RW (2004)

The burden of co-infection with human immunodeficiency virus type 1 and malaria in pregnant women in Sub-Saharan Africa

The American Society of Tropical Medicine and Hygiene 71: 41-54

The National AIDS Control Programme, The Policy Project, Lilongwe, Malawi (2001)

Estimating National HIV Prevalence in Malawi from Sentinel Surveillance Data

www.policyproject.com/pubs/countryreports/MalSS.pdf

Udomsangpetch R, Aikawa M, Berzins K, Wahlgren M, Perlmann P (1989)
Cytoadherence of knobless Plasmodium falciparum-infected erythrocytes and its inhibition by a human monoclonal antibody
Nature 338: 763-765

UNAIDS (2004)
2004 report on the global AIDS epidemic
www.unaids.org/en/geographical+area/by+country/malawi.asp

U.S. Census Bureau, UNAIDS, Population Reference Bureau, WHO (1999)
HIV/AIDS Profile: Malawi
www.census.gov.lipc/hiv/malawi.pdf

Waller KL, Cooke BM, Nunomura W, Mohandas N, Coppel RL (1999)
Mapping the Binding Domains Involved in the Interaction between the Plasmodium falciparum Knob-associated Histidine-rich Protein (KAHRP) and the Cytoadherence Ligand P. falciparum Erythrocyte Membrane Protein 1 (PfEMP1)
J. Biol. Chem. 274 (34): 23808-23813

Weiss ML (1985)
Plasmodium berghei: Ectopic Antibody Synthesis in Splenectomized Rodents
Experimental Parasitology 59: 108-117

Wickham ME, Rug M, Ralph SA, Klonis N, McFadden GI, Tilley L, Cowman AF (2001)
Trafficking and assembly of the cytoadherence complex in Plasmodium falciparum-infected human erythrocytes
The EMBO Journal 20 (20): 5636-5649

World Health Organisation (1997)
World Malaria Situation in 1994
Weekly Epidemiological Record 72 (36), Part I: 269-276

Wyler DJ, MD (1983)
Splenic Functions in Malaria
Lymphology 16: 121-127

Xiao L, Owen SM, Rudolph DL, Lal RB, Lal AA (1998)
Plasmodium falciparum Antigen-Induced Human Immunodeficiency Virus type 1 Replication is Mediated through Induction of Tumor Necrosis Factor- α
The Journal of Infectious Diseases 177: 437-445

Yipp BG, Anand S, Schollaardt T, Patel KD, Looareesuwan S, Ho M (2000)
Synergism of multiple adhesion molecules in mediating cytoadherence of P. falciparum-infected erythrocytes to microvascular endothelial cells under flow
Blood 96 (6): 2292-2298

9. Anhang

9.1. Votum der Ethikkommission

Telegram: Mbonoro, Lilongwe
Telephone: Lilongwe 783 044
Fax: 1 783 09
Communications should be addressed to:
The Secretary for Health and Population



MINISTRY OF HEALTH AND POPULATION
P.O. BOX 30377
CAPITAL CITY
LILONGWE
MALAWI

HSRC/10/98

2nd April, 1998

Dr. B. S. M. Mwale
Zomba Central Hospital
P.O. Box 21
Zomba

Dear Sir,

SPLENECTOMY OR SPLENIC REPAIR

Thank you very much for the above study proposal which was submitted to the National Health Sciences Research committee for consideration and approval.

Although the Committee felt this is a sensible topic for study, and approved it in principle, they pointed out a number of methodological flaws in the proposal. As the study would deal with patients already operated on, recall bias of the subjects is bound to be a problem. Also the number of patients in the two study groups is so small that the study is unlikely to demonstrate a statistically significant difference in outcome. Under-powered studies are ethically unacceptable.

The Committee would encourage you to set up a truly prospective cohort study in several centers, preferably including children. This would have the added advantage that informed consent can be obtained from subjects beforehand, and binding of researchers to the interventions can be assured.

Yours faithfully,

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'W M Kazembe'.

W M Kazembe

for:

SECRETARY FOR HEALTH AND POPULATION

9.2. Patientenfragebögen

Erhebungsfragebogen zur Patientenrekrutierung

Questionnaire 1 (Baseline Data)

Investigator:

Date/Time:

Patient's Name:

First Name:

Address (T/A, village):

geographical situation (river, altitude...):

How to contact (phone, relatives, business):

Age:

Sex:

Weight:

Hight:

Cause of ruptured spleen:

0. Injury and operation

(I.e. case file review)

Date of operation:

surgeon:

Other injuries:

Intra-operative complications:

Time since operation (in month):

1. History:

present complains:

(refer for details to: Z.C.H. medical case sheet)

Hx.

Findings:

Dx.

Tx.

transferred to Z.C.H.?(Date/Time of admission):

pregnant?

travel history:

MALARIA SEVERITY:

number of malaria attacks since the operation:

(rate per year:)

number of malaria attacks per month/per 3 month/per half year:

number of days with fever:

temperature?

subjective appearance of malaria symptoms after operation:

less severe

similar

more severe

number of Aspirin (any other „fever-drug“) taken during attacks:

Hx of severe malaria complications:

cerebral malaria:

(failure to stand, eat, drink, walk, talk?):

hypoglycaemia:

renal failure/urine:

(“black water fever”?)

CNS: delirious:
disorientated:
stupor:
coma:
convulsions:
focal signs:

Hx of any other severe infection:

Chest: (coughing, sputum)
abdomen: (vomiting, diarrhoea)
UGT: (STD, UTI, ulcers, haematuria)
skin:

2. Physical Examination:

gen. cond.:

vital signs: BP:
HR:
Temp.:
RR:

jaundice: anaemia: oedema:

lymph node status: cervical:
axillar:
inguinal:

chest: lung:
heart:

abdomen: liver: size:
tenderness:
spleen: size:
tenderness:

intestine: BS:
bladder:

kidneys:

anus:

genitals:

pregnancies: last:

extremities:

neurological status: olfactorian:

vision:

pupils:

convergens:

light reaction: direct:
indirect:

r l

eye movement:

trigeminus:

facialis:

hearing:

reflexes:

tonus:

power: mental status:

according to:

Any sign of immune-supression:

3. Laboratory Investigations:

Thick blood films:

Thin blood films:

Hb:

ESR:

Pat. needs malaria treatment:

Yes

No

Drug and dosage :

any other remark:

I was counselled about the use and the aim of the research and declare herewith my consent to participate in the study. I understand that this includes reporting truly and thoroughly about my health and previous diseases undergoing clinical and ultrasound investigation and giving blood samples for laboratory tests.

I know that I can withdraw from the study at any time but will still receive necessary treatment when being ill.

Date:

.....
Signature

abdomen:	heart:			
	liver:	size:		
		tenderness:		
	spleen:	size:		
		tenderness:		
	intestine:	BS:		
	bladder:			
kidneys:				
genitals:				
anus:				
extremities:				
neurological status:	olfactorian:			
	vision:			r l
	pupils:	convergens:	light reaction:	direct:
				indirect:
	eye movement:			
	trigeminus:			
	facialis:			
	hearing:			
reflexes:				
tonus:				
power:				
mental status:			according to whom:	

3. USS-report:

spleen:	size:	hilus:	parenchyma:
parasplenism:			
liver:			
kidneys:			
heart:			
other remarks:			

4. Laboratory Investigations:

Thick blood films:
Thin blood films:
Hb:
ESR:
Culture results:

Pat. needs malaria treatment:	Yes	No
Drug and dosage :		

9.3. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Modell einer pRBC mit „knob“ und PfEMP-1-Expression sowie verschiedene endotheliale Liganden	11
Abbildung 2: P. falciparum, Stadium 1	23
Abbildung 4: P. falciparum, Stadium 3	23
Abbildung 3: P. falciparum, Stadium 2	23
Abbildung 5: P. falciparum, Stadium 4	23
Abbildung 6: P. falciparum, Stadium 5	25
Abbildung 7: P. falciparum, Stadium 6	25
Abbildung 8: Gruppenverteilung aller zur Altersbestimmung genutzten Ausstriche	31
Abbildung 9: Totale Anzahl der Dicken Tropfen nach semiquantitativem Resultat in „pluses“ und Verteilung nach tatsächlichem Resultat der Parasitämiebestimmung	33
Abbildung 10: Semiquantitative Anzahl an „pluses“ im Verhältnis zur Parasitämie in 500 WBC	34
Abbildung 11: Totale Anzahl der dünnen Ausstriche nach semiquantitativem Resultat in „pluses“ und Verteilung nach tatsächlichem Resultat der Parasitämiebestimmung	36
Abbildung 12: Semiquantitative Anzahl an „pluses“ im Verhältnis zur Parasitämie in 500 RBC	37
Abbildung 13: Inzidenz positiver Malariaausstriche während des Untersuchungszeitraumes	40
Abbildung 14: Häufigkeitsverteilung der totalen Anzahl an „pluses“ nach der semiquantitativen Analyse zwischen Splenektomierten und Kontrollen im Dicken Tropfen und dünnen Ausstrich	41
Abbildung 15: Häufigkeitsverteilung der totalen Anzahl an „pluses“ nach der semiquantitativen Analyse zwischen Splenektomierten und Kontrollen im Dicken Tropfen und dünnen Ausstrich, Februar 2000	42
Abbildung 16: Relative Anzahl älterer Stadien im Verhältnis zur totalen Parasitenanzahl (Parasitämie) unabhängig vom Milzstatus	43
Abbildung 17: Relative Anzahl älterer Stadien im Verhältnis zur totalen Parasitenanzahl (Parasitämie) abhängig vom Milzstatus	44
Abbildung 18: Relative Anzahl älterer Parasiten innerhalb aller jemals klassifizierten Ausstriche (identischer Patientenpunkte) Splenektomierte vs. Kontrollen	47
Abbildung 19: Häufigkeitsverteilung der Anzahl an „pluses“ in allen Dicken Tropfen von HIV-Positiven während des gesamten Untersuchungszeitraumes	55
Abbildung 20: Häufigkeitsverteilung der Anzahl an „pluses“ in allen dünnen Ausstrichen von HIV-Positiven während des gesamten Untersuchungszeitraumes	56

9.4. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Aussagen der Routinediagnostik für Malaria in Malawi, semiquantitative Analyse zur Beurteilung der Parasitendichte im Dicken Tropfen, 1000-fache Vergrößerung in Ölimmersion	22
Tabelle 2: Patientengruppen	28
Tabelle 3: Alters- und Geschlechtsverteilung innerhalb der Gruppen	28
Tabelle 4: Konstitutionelle Parameter innerhalb der Gruppen	29
Tabelle 5: Tätigkeiten/Berufe innerhalb der Gruppen	29
Tabelle 6: Gruppeneinteilung basierend auf Ultraschallergebnis	30
Tabelle 7: Verteilung der Dicken Tropfen nach semiquantitativem und tatsächlichem Resultat der Parasitenbestimmung in Positive und Negative	32
Tabelle 8: Verteilung der Dicken Tropfen nach semiquantitativem Resultat in „pluses“ und tatsächlichem Resultat der Parasitenbestimmung in Positive und Negative	33
Tabelle 9: Verteilung der dünnen Ausstriche nach semiquantitativem und tatsächlichen Resultat der Parasitenbestimmung in Positive und Negative	35
Tabelle 10: Verteilung der dünnen Ausstriche nach semiquantitativem Resultat in „pluses“ und tatsächlichem Resultat der Parasitenbestimmung in Positive und Negative	36
Tabelle 11: Alle Ausstriche von Splenektomierten, die jemals klassifiziert wurden	38
Tabelle 12: Alle Ausstriche von Kontrollen, die jemals klassifiziert wurden	39
Tabelle 13: Vorkommen älterer Stadien in allen jemals klassifizierten Ausstrichen	45
Tabelle 14: Relative Anzahl älterer Stadien in allen jemals klassifizierten Ausstrichen	46
Tabelle 15: Relative Anzahl älterer Stadien in allen jemals klassifizierten Ausstrichen im auf USS-Ergebnis basierenden Gruppensystem	48
Tabelle 16: Häufigkeit der Überschreitung der Schnittlinien für den Anteil älterer Stadien in dem auf USS-basierendem Gruppensystem und Signifikanztestung mit Mann-Whitney-bilateral-exact-U-Test	49
Tabelle 17: Häufigkeit der Überschreitung der Schnittlinien für den Anteil älterer Stadien während Parasitämie im auf USS-basierenden Gruppensystem und Signifikanztestung mit Mann-Whitney-bilateral-exact-U-Test und T-Test	51
Tabelle 18: HIV-Status der Patienten zu Beginn des Untersuchungszeitraumes zwischen 1. und 3. Nachuntersuchung	53
Tabelle 19: HIV-Status am Ende des Untersuchungszeitraumes	54
Tabelle 20: Häufigkeiten der Anzahl an „pluses“ im Dicken Tropfen, HIV-Positive	55
Tabelle 21: Häufigkeiten der Anzahl an „pluses“ im dünnen Ausstrich, HIV-Positive	56
Tabelle 22: Häufigkeit des Vorkommens älterer Parasitenstadien in allen bewerteten Ausstrichen von HIV-Positiven	57
Tabelle 23: Relative Anzahl älterer Parasitenstadien in allen bewerteten Ausstrichen von HIV-Positiven und HIV-Negativen unabhängig vom Milzstatus	58

Tabelle 24: Relative Anzahl älterer Parasitenstadien in allen bewerteten Ausstrichen von milzlosen HIV-Positiven und HIV-Negativen.....	59
Tabelle 25: Häufigkeit des Vorkommens älterer Parasitenstadien in HIV-Positiven	60
Tabelle 26: Relative Anzahl älterer Parasitenstadien in HIV-Positiven und HIV-Negativen unabhängig vom Milzstatus	61
Tabelle 27: Relative Anzahl älterer Parasitenstadien in milzlosen HIV-Positiven und HIV-Negativen.....	61

10. Tabellarischer Lebenslauf

zur Person

Name: Pullwitt, Annika Gabriele
Geburtsdatum: 29.12.1978
Geburtsort: Leipzig
Familienstand: ledig
Kinder: Wangu Pullwitt, geboren am 22.06.2005
Staatsangehörigkeit: deutsch
Adresse: Jansonstrasse 11, 07745 Jena

zur Schulbildung

1985 bis 1986 Lindenoberschule Meerane
1986 bis 1991 Wilhelm-Pieck-Oberschule Leipzig
1991 bis 1992 Sportschule Brüderstraße Leipzig, Leistungsklasse
1992 bis 1997 Felix Klein Gymnasium Leipzig

1997 Abitur

zum Studium

04/1998 bis 09/2001 Humanmedizin, Freie Universität Berlin
10/2001 bis 03/2005 Humanmedizin, Friedrich-Schiller-Universität Jena
seit 04/2005 Promotionsstudium Humanmedizin, Friedrich-Schiller-Universität Jena

15.11.2004 Staatsexamen Humanmedizin, Friedrich-Schiller-Universität Jena

Ort/Datum

Jena, 21.11.2005

Unterschrift

11. Danksagung

Ich möchte mich recht herzlich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. Wolfgang Pfister dafür bedanken, dass er die Betreuung meiner Arbeit übernommen hat sowie für seine freundliche und engagierte Unterstützung bei der Erstellung des Manuskriptes.

Ein besonderer Dank gebührt meinem Betreuer Dr. med. habil. Olaf Bach für die Vergabe der Promotionsarbeit, die es mir ermöglichte nach Malawi zu reisen, und seine großartige Hilfe bei der Bearbeitung des Themas sowie der Erstellung des Manuskriptes. Als Initiator der gesamten Studie in Malawi hat er maßgeblichen Anteil am Erfolg meiner Arbeit.

Ich danke Dr. Michael Baier, der ebenfalls in großem Maße an der Auswertung der Studie beteiligt war und darüber hinaus jederzeit ein offenes Ohr bei Fragen und Problemen hatte.

Ich bedanke mich weiterhin bei Prof. Malcom Molyneux (Welcome Trust Research Laboratory Blantyre) und Herrn Nedson Fosiko (College of Medicine Blantyre) für ihre Hilfe beim Erlernen und ihre Geduld bei der Durchführung der Malariamikroskopie.

Ein Dank geht an alle weiteren beteiligten Personen, besonders auf malawischer Seite, die durch ihren Einsatz zum Gelingen der Studie beigetragen haben.

Ein Dankschön geht auch an das Institut für Pathologie der FSU Jena für die Hilfe bei der Fotografie der Malariaparasiten.

Meiner Familie danke ich für ihre liebevolle und großzügige Unterstützung, auf die ich jederzeit und in allen Lebenslagen zählen kann. Das ist sehr wichtig für mich und hat wesentlich dazu beigetragen, dass ich diese Arbeit beginnen und letztendlich auch beenden konnte. Ich hoffe, dass sie auch weiterhin stolz auf mich sein können.

Ich danke meinem, am 22.06.2005 geborenen, Sohn Wangu für Schlaf und Geduld, was die endgültige Fertigstellung meiner Arbeit ermöglichte.

Ich bedanke mich bei meinen Freunden Tilo und Sabine Martens, die mir bei vielen nötigen Details wie das Erstellen der Fotos, Satz und Korrektur der Arbeit hilfreich zur Seite standen, sowie Sven und Diana, die bei Computerproblemen und anderen Fragen halfen.

12. Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: Prof. Dr. Wolfgang Pfister, Dr. Olaf Bach und Dr. Michael Baier,

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Jena, den 21.11.2005

Unterschrift: